

***Kigelia africana* induziert Apoptose von Neuroblastomzellen im Stadium 3 und aktiviert intrazelluläre Signalwege über NFκB-Phosphorylierung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer  
Doktorin der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Clara Frieda Schwippert

aus

Hamburg

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Konrad Reinshagen

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Ingo Müller

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Ingo Müller

Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Björn-Philipp Diercks

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Ulrich Schüller

Datum der mündlichen Prüfung: 26.11.2025

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1	Neuroblastom.....	6
1.1.1	Epidemiologie.....	6
1.1.2	Ätiologie.....	6
1.1.3	Klinik.....	8
1.1.4	Diagnostik.....	10
1.1.5	Staging .....	11
1.1.6	Therapie und Prognose.....	13
1.1.7	Immuntherapie des Neuroblastoms .....	14
1.2	Molekularbiologische Grundlagen des Neuroblastoms.....	15
1.2.1	MYCN-Protoonkogen .....	15
1.2.2	Disialogangliosid 2 .....	16
1.3	Mechanismen der Apoptoseregulation und Zellzykluskontrolle .....	16
1.3.1	NFκB .....	16
1.3.2	EGF-Rezeptor .....	20
1.4	<i>Kigelia africana</i> .....	21
1.4.1	Grundlagen.....	21
1.4.2	Pharmakologisches Potential .....	22
1.4.3	Antineoplastische Wirkung .....	23
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1	Laborgeräte.....	25
3.2	Verbrauchsmaterialien .....	25
3.3	Bearbeitungs- & Auswertungsprogramme .....	26
3.4	Puffer und Lösungen.....	26
3.5	Zellkultur .....	28
3.6	<i>Kigelia africana</i> Extrakt .....	29
3.7	Zellzahlbestimmung .....	30
3.8	Vitalitätsmessung nach <i>Kigelia africana</i> Exposition.....	30
3.9	Durchflusszytometrie der GD2-Exprimierung und Apoptose .....	32
3.10	Proteinnachweis mittels Western Blot.....	33
3.10.1	Herstellung von Gesamtzelllysaten.....	33

3.10.2	Proteinbestimmung der Gesamtzelllysate .....	34
3.10.3	Western Blot Durchführung.....	35
3.11	Immunfluoreszenz.....	37
3.12	Statistische Methoden.....	39
3.12.1	Auswertung des Vitalitätsversuchs .....	40
3.12.2	Western-Blot-Auswertung .....	40
3.12.3	Durchflusszytometrie-Auswertung .....	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
4.1	Phytochemische Analyse des KA-Extraktes .....	41
4.2	Einfluss der <i>Kigelia africana</i> auf die Zellvitalität.....	42
4.2.1	CCD-1064-SK-Zelllinie .....	42
4.2.2	LS-Zelllinie.....	43
4.2.3	NB69-Zelllinie .....	44
4.3	FACS-Analyse nach <i>Kigelia africana</i> Exposition .....	45
4.3.1	GD2-Exprimierung.....	45
4.3.2	Apoptosemessung.....	46
4.4	Western Blot: NF $\kappa$ B-Induktion in Neuroblastomzellen durch <i>Kigelia africana</i> Behandlung.....	48
4.4.1	CCD-1064-SK-Zelllinie .....	48
4.4.2	LS-Zelllinie.....	49
4.4.3	NB69-Zelllinie .....	51
4.5	Immunfluoreszenz.....	52
4.5.1	Neuroblastomzellen zeigen KA-induzierte EGFR-Translokation .....	53
4.5.2	GD2-Expression variiert nach KA-Behandlung .....	53
4.5.3	Neuroblastomzellen zeigen NF $\kappa$ B-Aktivierung nach KA- und Propandiol- Behandlung .....	53
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>67</b>
6.1	Summary.....	68
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>78</b>



<b>12</b>	<b>Erklärung des Eigenanteils .....</b>	<b>79</b>
<b>13</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>80</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Neuroblastom

### 1.1.1 Epidemiologie

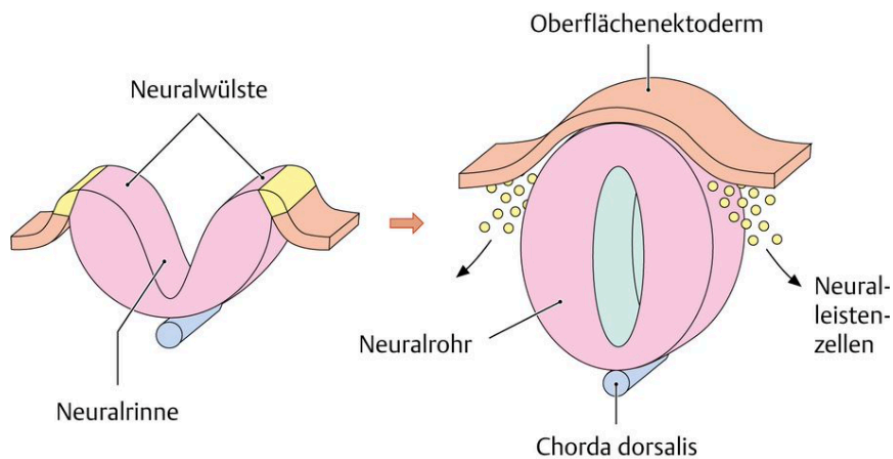
Das Neuroblastom (NB) ist die am häufigsten innerhalb des ersten Lebensjahres diagnostizierte Krebsart und gilt als der zweithäufigste solide Tumor im Kindesalter weltweit (Aygün, 2018).

Neuroblastome sind neuroektodermale, embryonale Tumoren des sympathischen Nervensystems. Betroffen sind zumeist junge Kinder mit einem mittleren Erkrankungsalter von 14 Monaten (Simon et al., 2019). Während der Großteil der betroffenen Kinder noch vor Eintritt in die Schule erkrankt, nimmt die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei älteren Kindern ab, und nur sehr selten sind auch Erwachsene betroffen (Simon et al., 2019). Das Neuroblastom macht mit 10,5 Fällen pro einer Million Kindern in Europa und Nordamerika rund 10% der Krebserkrankungen und 15% der krebsbedingten Todesfälle bei Kindern unter 15 Jahren aus (Whittle et al., 2017). Jungen haben eine um 40% höhere Erkrankungsrate als Mädchen (Erdmann et al., 2020). Insgesamt liegt die Überlebensrate für Erkrankte bei etwa 77% (Erdmann et al., 2020). Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium und hohem Risikoprofil haben jedoch trotz einiger Therapiefortschritte der letzten Jahre eine schlechte Prognose (Erdmann et al., 2020, Simon et al., 2019).

### 1.1.2 Ätiologie

Die erstmalige wissenschaftliche Erwähnung eines Neuroblastoms lässt sich ins Jahr 1864 zurückdatieren, wo es von Rudolf Virchow beschrieben wurde (Nieder and Gauderer, 1991). Der Begriff „Neuroblastom“ wurde 1910 von James Homer Wright eingeführt, der erstmalig die Abstammung des Tumors von primitiven Neuralzellen beschrieb (Wright, 1910). Die rosettenförmigen Tumorzellnester werden noch heute „Homer-Wright-Rosetten“ genannt. Heute ist bekannt, dass Neuroblastome tatsächlich ihren Ursprung in den Vorläuferzellen der Neuralleiste finden (Simon et al., 2019). Unter physiologischen Umständen wandern die

Vorläuferzellen des sympathischen Nervengewebes im Laufe der embryonalen Entwicklung aus und differenzieren sich zu spezifischem Gewebe (siehe Abb. 1) (Whittle et al., 2017). Durch Defekte in diesem Vorgang der Migration und Differenzierung kann es jedoch im Verlauf zur Entstehung von Neuroblastomen kommen (Whittle et al., 2017).



**Abb. 1: Schematische Darstellung des Neuralrohrs und der Neuralleiste.** Die Neuralleistenzellen wandern aus und differenzieren sich zu spezifischem Gewebe. (Schünke et al., 2012)

Trotz der langen Bekanntheit des Neuroblastoms ist die genaue Ätiologie bis heute nicht abschließend erforscht. Das Neuroblastom ist ein heterogener Tumor, der verschiedene chromosomale und molekulargenetische Variationen aufweisen kann. Vor allem durch die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben sich einige ursächliche molekulare Merkmale und ihre Auswirkungen auf die Prognose herauskristallisiert. Es kann zwischen dem familiären und dem sporadisch auftretenden Neuroblastom unterschieden werden:

### **Familiäres Neuroblastom:**

Der Großteil der Neuroblastome tritt sporadisch auf, jedoch sind 1-2% aller NB auf familiäre Vererbung zurückzuführen und folgen einem autosomal-dominanten Erbgang (Ritenour et al., 2018). Das familiäre NB wird insbesondere mit Keimbahnmutationen im Gen der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) oder des Paired Like Homeobox 2B Gens (PHOX2B) assoziiert (Aygün, 2018, Nakagawara et al., 2018). Mutationen im PHOX2B-Gen sind laut aktuellen

Studien für ca. 10% der familiären Neuroblastome ursächlich (Ritenour et al., 2018). Das ALK-Gen kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die durch Punktmutationen konstitutiv aktiviert werden kann (Ritenour et al., 2018). Sie ist für ihre Rolle in der Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen bekannt. Mutationen in diesem Gen konnten in 75% der familiären Neuroblastome als prädisponierender Faktor identifiziert werden (Ritenour et al., 2018). Zusätzlich ist das ALK-Gen in bis zu 8% somatisch mutiert, sodass es auch als eines der am häufigsten somatisch mutierten Gene im sporadischen NB gilt (Ritenour et al., 2018).

### **Sporadisches Neuroblastom:**

Die sporadische Entstehung von Neuroblastomen tritt deutlich häufiger auf als die familiäre Form und scheint auf verschiedenen genetischen Faktoren zu basieren. Einige dieser Faktoren konnten mittels genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) identifiziert werden und haben mittlerweile prognostische Relevanz (Ritenour et al., 2018). Faktoren, welche die Entwicklung sporadischer NB bewirken können, sind u.a. der Verlust oder Gewinn von Allelen, die Aktivierung von Onkogenen und Veränderungen der Zellploidie. Während triploide Chromosomensätze und die Expression des Neurotrophin-Rezeptors TrkA eine günstigere Prognose bedeuten, sind strukturelle chromosomale Aberrationen mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Hierzu zählen u.a. 1p- und 11q-Deletionen, der Gewinn von 17q und die Amplifikation des MYCN-Protoonkogens. (Brodeur, 2003)

Die Amplifikation des zur Myc-Familie gehörenden Transkriptionsfaktors MYCN kann bei 20-30% der NB festgestellt werden und wird mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und schlechten Überlebensraten assoziiert (Chang et al., 2020). MYCN spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Zellen in der ZNS-Entwicklung und wird durch unterschiedliche Signalwege reguliert (Cheung and Dyer, 2013).

### 1.1.3 Klinik

Das Neuroblastom zeichnet sich durch einen sehr heterogenen Krankheitsverlauf und die unterschiedliche Prognose der Patientengruppen aus.

Der Verlauf variiert von spontaner Regression des Primärtumors inklusive Metastasen bis zu hoch aggressiven, therapieresistenten Tumoren in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Simon et al., 2019). Die Möglichkeit der spontanen Regression von Neuroblastomen ohne die Notwendigkeit einer therapeutischen Intervention ist insbesondere bei Säuglingen mit metastatischer Ausbreitung bekannt (Brodeur, 2018). Die zugrundeliegenden Mechanismen der Regression sind noch nicht abschließend geklärt, jedoch könnte deren Häufigkeit aufgrund einer hohen Dunkelziffer bedeutend höher sein als bisher vermutet (Brodeur, 2018). Aufgrund ihrer neuroektodermalen Abstammung entstehen die meisten Neuroblastome entlang des sympathischen Grenzstranges oder im Nebennierenmark. Insgesamt befinden sich ca. 46% der Primärtumoren im Bereich der Nebennieren, 18% intraabdominal entlang des Grenzstrangs, 14% intrathorakal und die übrigen Prozent u.a. im Becken oder zervikal (Swift et al., 2018). Aufgrund von unspezifischen Symptomen besitzen etwa die Hälfte aller Patienten zum Diagnosezeitpunkt bereits Fernmetastasen. Diese befinden sich zumeist in Knochenmark (86%), Knochen (62%), Lymphknoten (19%) oder Leber (17%) (Simon et al., 2019). Je nach Lage und Ausbreitung des Primärtumors und der Metastasen sind erkrankte Kinder meist lange asymptomatisch oder zeigen nur unspezifische Symptome. Ca. 40% aller Neuroblastome werden daher zufällig, u.a. im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen, entdeckt (Simon et al., 2019). Betroffene Patienten zeigen u.a. allgemeine Symptome wie Gewichtsverlust, Abgeschlagenheit und Fieber (Simon et al., 2019). Bei abdominalen Tumoren kann es zu abdominalen Schmerzen, Obstipation und Auftreiben des Abdomens mit palpabler Tumormasse kommen. Je nach Lokalisation können zudem lagespezifische Symptome wie motorische und sensible Ausfälle bei Tumorausdehnung im Bereich des Rückenmarks, Brillenhämatome bei Infiltration der Orbitae sowie Horner-Syndrom und respiratorischen Störungen bei zervikaler oder thorakaler Ausbreitung hinzukommen (Colon and Chung, 2011). In einigen Fällen kann es zu paraneoplastischen Symptomen infolge der erhöhten Produktion vasoaktiver Substanzen kommen (Colon and Chung, 2011).

### 1.1.4 Diagnostik

Die Diagnose des Neuroblastoms lässt sich histologisch anhand einer Tumorbioptie oder zytologisch bei eindeutigem Knochenmarkbefall und gleichzeitig erhöhten Katecholamin-Metaboliten in Blut und oder Urin stellen (Simon et al., 2019). Hierfür können verschiedene Testverfahren in Kombination mit bildgebenden Maßnahmen zu Hilfe gezogen werden. Die Bestimmung der Katecholamin-Metabolite Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure im Spontanurin sowie die Bestimmung der Neuronenspezifischen Enolase (NSE) im Serum sind häufig genutzte diagnostische Mittel. Als bildgebende Verfahren dienen u.a. die abdominelle Sonographie, Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT), mit deren Hilfe sich Primärtumoren und etwaige Metastasen darstellen lassen. Ein Neuroblastom lässt sich meist als eine solide Raumforderung darstellen, die in 30-90% Kalzifizierungen enthält. Typisch für das Neuroblastom ist das Umhüllen oder Verdrängen von naheliegenden Blutgefäßen. (Simon et al., 2019)

Zusätzlich ist die I-MIBG-Szintigraphie von großem Nutzen für Diagnose und Staging des Neuroblastoms. Metaiodobenzylguanidin (MIBG) ist ein Analogon des Neurotransmitters Norepinephrin und wird von neuroendokrinen Zellen und somit auch von den meisten Neuroblastomzellen aufgenommen. Durch die Markierung von MIBG mit radioaktivem Iod lässt sich so ein Großteil der Neuroblastome darstellen (Bleeker et al., 2015). Die eindeutige Diagnose des Neuroblastoms lässt sich mittels histologischer Aufarbeitung von Tumorgewebe stellen. Neuroblastome werden aufgrund ihrer kleinen Zellen mit runden, chromatindichten Zellkernen zu den malignen Rundzelltumoren gezählt (Swift et al., 2018). Im Hinblick auf das Staging und die Erstellung eines adäquaten Therapieschemas können im Verlauf weitere Tumorbioptien, Knochenmarksuntersuchungen, immunzytologische Untersuchungen und molekulargenetische Analysen hinzugezogen werden (Simon et al., 2019). Da Screeningprogramme insbesondere frühe Erkrankungsstadien mit Tendenz zur spontanen Regression entdeckten, schienen sie die Mortalität des Neuroblastoms nicht zu senken und werden daher bisher nicht empfohlen (Schilling et al., 2002).

### 1.1.5 Staging

Für das Staging von Neuroblastomen existieren zwei unterschiedliche Klassifikationssysteme, die oft in Kombination genutzt werden. Das „International Neuroblastoma Risk Group Staging System“ (INRGSS) ermöglicht das Staging bereits vor der Therapie, während das ältere „International Neuroblastoma Staging System“ (INSS) für die Stadieneinschätzung nach der Therapie entwickelt wurde. Hierfür werden beim INRGSS bestimmte radiologisch definierte Kriterien, sogenannte „Image Defined Risk Factors“ (IDRF) genutzt, die durch bildgebende Verfahren untersucht werden (Swift et al., 2018). In der folgenden Abbildung 2 wird die Stadieneinteilung des Neuroblastoms anhand der beiden Klassifikationssysteme dargestellt.

INSS		INRGSS	
1	Lokalisierter Tumor nach kompletter Resektion mit oder ohne mikroskopische Reste, repräsentative ipsilaterale und kontralaterale Lymphknoten mikroskopisch frei von Tumor, dem Tumor anhängende Lymphknoten können infiltriert sein.  Makroskopisch entfernte Mittellinientumoren ohne Lymphknoteninfiltration werden als Stadium 1 klassifiziert.	L1	Lokalisierter Tumor ohne Nachweis von IDRF und begrenzt auf eine Körperhöhle
2A	Lokalisierter Tumor nach incompletter Entfernung, repräsentative nichtadhärente Lymphknoten mikroskopisch frei von Tumor.		
2B	Lokalisierter Tumor nach kompletter oder incompletter Resektion, Nachweis einer Infiltration von ipsilateralen, nichtadhärente Lymphknoten, kontralaterale nichtadhärente Lymphknoten frei von Tumor	L2	Lokalisierter Tumor mit Nachweis von einem oder mehreren IDRF
3	Nicht resektabler unilateraler Tumor mit Ausdehnung über die Mittellinie mit oder ohne Infiltration der regionalen Lymphknoten;  oder lokalisierter Tumor mit Infiltration der kontralaterale nichtadhärenten Lymphknoten;  oder Mittellinientumor mit bilateraler infiltrativer Ausdehnung oder Lymphknoteninfiltration.  (Die Mittellinie ist definiert als die kontralaterale Begrenzung der Wirbelsäule.)		
4	Metastasierung in Fernlymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder andere Organe, die nicht der Definition des Stadium 4S entspricht.	M	Nachweis von Fernmetastasen (außer Stadium MS)
4S	Lokalisierter Tumor Stadium 1, 2A oder 2B mit Metastasierung in Leber, Haut oder Knochenmark (maximal 10%, nicht detektierbar in der MIBG Szintigraphie) bei Säuglingen < 1 Jahr bei Diagnosestellung	MS	Metastatische Erkrankung bei Kindern im Alter <18 Monate mit Metastasen begrenzt auf Haut, Leber und Knochenmark.
Multifokale Tumoren werden entsprechend der Ausdehnung des größten Tumors klassifiziert. Das Stadium wird als M gekennzeichnet, beispielsweise 3M		Multifokale Tumoren werden entsprechend der Ausdehnung des größten Tumors klassifiziert.	

**Abb. 2: Klassifikationssysteme des Neuroblastoms.** Das INSS gilt nach chirurgischer Resektion, während das neuere INRGSS schon vor der Therapie genutzt werden kann. („INSS und INRG Stadieneinteilung des Neuroblastoms“, Deutsche S1-Leitlinie 025-008 Neuroblastom (Simon et al., 2019))



### 1.1.6 Therapie und Prognose

Das Therapieschema für NB-Patienten folgt einem komplexen System, welches auf der Einteilung in Gruppen mit niedrigem, mittlerem und hohem Risiko beruht (siehe Abb. 3) (Swift et al., 2018). Diese Gruppeneinteilung beruht auf den durch die INSS/INRGSS bestimmten Erkrankungsstadien in Zusammenschau mit Risikofaktoren wie dem Patientenalter bei Diagnosestellung, Tumorphistologie sowie biologischen und genetischen Aspekten des Tumors. Zwischen den drei Risikogruppen unterscheiden sich die Therapieintensität und -dauer sowie die Prognose deutlich. Als ungünstige prognostische Faktoren gelten ein Alter von >18 Monaten bei Diagnosestellung, eine vorhandene Amplifikation des MYCN-Gens und der Nachweis von Fernmetastasen (Simon et al., 2019). Während sich der Trend bei Patienten mit niedrigem Risiko in den letzten Jahren zunehmend zur Reduktion der Therapieintensität entwickelte, wird die multimodale Therapie für Hochrisikopatienten aufgrund der unzureichenden Therapieerfolge und niedrigen Langzeitüberlebensraten weiter intensiviert (Maris, 2010).

Risk	MYCN amplification	Stage*	Age at diagnosis	Overall survival (%)	Current treatment approach
Low risk	No	4S	<12 months	>91 ± 2 <sup>‡</sup>	Supportive care
	No	Locoregional	≤21 years	>95 <sup>‡</sup>	Surgery ± chemotherapy <sup>§</sup>
Intermediate risk	No	4	<18 months	89 ± 2 <sup>‡</sup>	Surgery and moderate intensity chemotherapy
High risk	Yes	Locoregional	≤21 years	53 ± 4 <sup>‡</sup>	Dose-intensive chemotherapy, surgical resection of residual primary tumour, radiation to primary and resistant metastatic sites, myeloablative therapy with autologous stem cell rescue, anti-GD2 immunotherapy and 13-cis-retinoic acid
	Yes	4	<18 months	29 ± 4 <sup>‡</sup>	
	Yes or no	4	≥18 months and ≤21 years	31 ± 1 <sup>‡</sup>	
	No	4	≥12 years	<10 <sup>  </sup>	

**Abb. 3: Einteilung von Neuroblastompatienten in drei Risikogruppen.** Das Therapieschema und die Überlebenswahrscheinlichkeit von NB-Patienten variiert je nach vorhandenen Risikofaktoren. (*“Survival from neuroblastoma is influenced by tumour MYCN status, stage and age at diagnosis”*, (Cheung and Dyer, 2013))

Patienten der geringen Risikogruppe, die einer therapeutischen Intervention benötigen, werden zumeist operativ behandelt. Eine Chemotherapie ist in den meisten Fällen nicht indiziert (Hero et al., 2008). Bei Patienten der mittleren Risikogruppe wird ebenfalls die operative Tumorsektion angestrebt, ggfs. in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie (Simon et al., 2019). Die

Hochrisikogruppe erfordert dagegen multimodale Therapiekonzepte mit hoher Intensität und Dauer. Die Therapieschemata umfassen hier u.a. hochdosierte Chemotherapien, autologe Stammzelltransplantation, operative Tumoresektion, Strahlentherapie, I-MIBG-Therapie und Immuntherapie (Simon et al., 2019). Es besteht eine große Diskrepanz zwischen der sehr guten Prognose für Patientengruppen mit geringem Risikoprofil und den deutlich schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeiten für die Patienten mit hohem Risikoprofil und starker Therapiebelastung. In der niedrigen und mittleren Risikogruppe sind die Therapieerfolge sowie das Langzeitüberleben mit >95% und 80-95% sehr gut (Swift et al., 2018). Die Überlebensrate bei Patienten der Hochrisikogruppe beträgt jedoch lediglich höchstens 50% (Simon et al., 2019). Etwa die Hälfte aller an Neuroblastom erkrankten Kinder zählen zu dieser Risikogruppe und die Gesamtüberlebensrate bei Neuroblastomrezidiven liegt weitaus niedriger (Whittle et al., 2017).

### 1.1.7 Immuntherapie des Neuroblastoms

Neuroblastome können sich dem Immunsystem und somit der Detektion durch T-Zellen und natürliche Killerzellen durch eine immunsuppressive Tumorumgebung entziehen. Den Tumorzellen gelingt dies beispielsweise durch die Herunterregulierung von Erkennungs- und Adhäsionsmolekülen, der Rekrutierung von Gewebsmakrophagen sowie der Expression von Proteinen zur T-Zell-Inhibition (Cheung and Dyer, 2013).

Die meisten Neuroblastomzellen exprimieren unabhängig vom Stadium der Erkrankung das Disialogangliosid 2 (GD2) ubiquitär auf ihrer Zelloberfläche, während es von normalem Gewebe kaum exprimiert wird (Sait and Modak, 2017). Aufgrund dieser Tatsache eignet sich GD2 gut als potenzielles Ziel für eine Immuntherapie. Patienten mit Behandlung mit dem GD2-Antikörper Dinutuximab zeigen eine signifikante Verbesserung der Gesamtüberlebensrate (Sait and Modak, 2017). Auch die Kombination des GD2-AK mit Zytokinen und die Behandlung von NB-Rezidiven mit Dinutuximab ließen in den vergangenen Jahren auf ein verbessertes Überleben hoffen (Mohd et al., 2023). Trotz der vielversprechenden therapeutischen Ergebnisse gibt es gewisse Limitationen für die Immuntherapie. Zu den häufigsten Nebenwirkungen nach Therapie mit Anti-

GD2-Antikörpern gehören starke neuropathische Schmerzen, Aminotransferasenerhöhung, Anämie, Capillary-Leak-Syndrom, Diarrhö, Erbrechen, Neutropenie, Thrombozytopenie und Fieber (Mueller et al., 2018, Nazha et al., 2020). Neben der Anti-GD2-Therapie gibt es Studien zu alternativen Ansatzpunkten für die Immuntherapie des Neuroblastoms, sodass die Entwicklung weiterer immuntherapeutischer Ziele in Zukunft wahrscheinlich ist. Als potentiell Ziel für Impfungen oder spezifische zytotoxische T-Zellen wird u.a. das MYCN-Protoonkogen beforscht (Ruiz-Pérez et al., 2017).

## 1.2 Molekularbiologische Grundlagen des Neuroblastoms

Aufgrund der komplexen Entstehungsmechanismen und Molekulargenetik von Neuroblastomzellen soll hier ein Überblick über die wichtigsten molekularbiologischen Aspekte gegeben werden, die in dieser Forschungsarbeit behandelt werden.

### 1.2.1 MYCN-Protoonkogen

N-Myc (auch genannt MYCN) gehört zur Familie der Myc-Protoonkogene, die für Transkriptionsfaktoren vielschichtiger zellulärer Prozesse kodieren. Als Mitglied der Myc-Familie spielt MYCN eine regulatorische Rolle bei Mechanismen des Zellwachstums, der Apoptose und der Zelldifferenzierung sowie bei der Entstehung von Krebserkrankungen. Physiologischerweise ist MYCN zudem an der Regulation des Zellzyklus und des Energiestoffwechsels der Zelle beteiligt. (Ruiz-Pérez et al., 2017)

MYCN-Dysregulation konnte speziell in Assoziation zu malignen Erkrankungen der Kindheit, insbesondere auch zum Neuroblastom, beobachtet werden (Ruiz-Pérez et al., 2017). Sie konnte beim Neuroblastom als treibender Faktor für Tumorzellüberleben und -proliferation, Metastasierung und Angiogenese identifiziert werden und steht in direktem Zusammenhang mit schlechter Prognose und Therapieversagen (Huang and Weiss, 2013). Zusätzlich scheint die Überexpression von MYCN Gene zu unterdrücken, die für Zelldifferenzierung, Zellzyklusregulation und die Detektion von Tumorzellen durch das Immunsystem zuständig sind (Huang and Weiss, 2013).

### 1.2.2 Disialogangliosid 2

Disialogangliosid 2 (GD2) gehört zu den Gangliosiden und wird der Gruppe der Glykosphingolipide zugeordnet. Nach der zellinternen Synthese werden Ganglioside an die Zellmembran transportiert, wo sie als Oberflächenproteine die Signaltransduktion und Zellkommunikation beeinflussen und der Adhäsion dienen. Die meisten Ganglioside werden weit verbreitet von verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert und erfüllen variable biologische Funktionen. GD2 im Gegensatz wird normalerweise fast ausschließlich von Zellen des ZNS und peripheren Nervenzellen sowie Hautmelanozyten ausgebildet. Wie auch andere Ganglioside ist GD2 vermutlich an der Zellkommunikation beteiligt, die genaue physiologische Funktion scheint aber bis heute nicht vollständig verstanden zu sein. (Nazha et al., 2020)

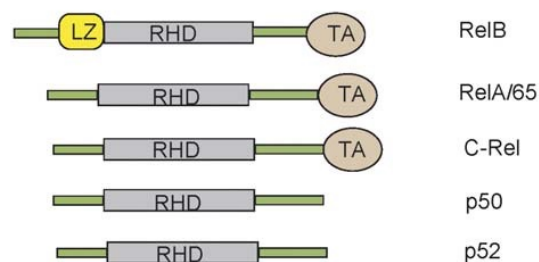
Zusätzlich zu der spezifischen physiologischen Expression wird GD2 auch von einer Vielzahl embryonaler Tumoren gebildet. Mit geschätzten 5-10 Millionen Molekülen je Zelle zeigen die meisten Neuroblastomzellen eine hohe Anzahl an GD2-Molekülen, wobei die Expression unabhängig vom Krankheitsstadium zu sein scheint (Sait and Modak, 2017). Neben Neuroblastomen zeigen u.a. auch Retinoblastome, Ewing-Sarkome, bestimmte Hirntumoren und Brustkrebszellen eine GD2-Expression (Sait and Modak, 2017). Im Rahmen von Krebserkrankungen geht eine GD2-Expression mit erhöhter Tumorzellproliferation, Migration, Invasion und Apoptoseresistenz einher (Nazha et al., 2020). Durch die eingeschränkte Expression in physiologischem Gewebe und Überexpression in kanzerogenem Gewebe ist GD2 ein attraktives Ziel in der Krebstherapie.

## 1.3 Mechanismen der Apoptoseregulation und Zellzykluskontrolle

### 1.3.1 NF $\kappa$ B

NF $\kappa$ B („Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“) ist eine Familie von in den meisten Säugetierzellen vorkommenden Transkriptionsfaktoren, die in eine große Vielfalt von zellulären Prozessen eingebunden sind. NF $\kappa$ B spielt eine essenzielle Rolle in der adaptiven und

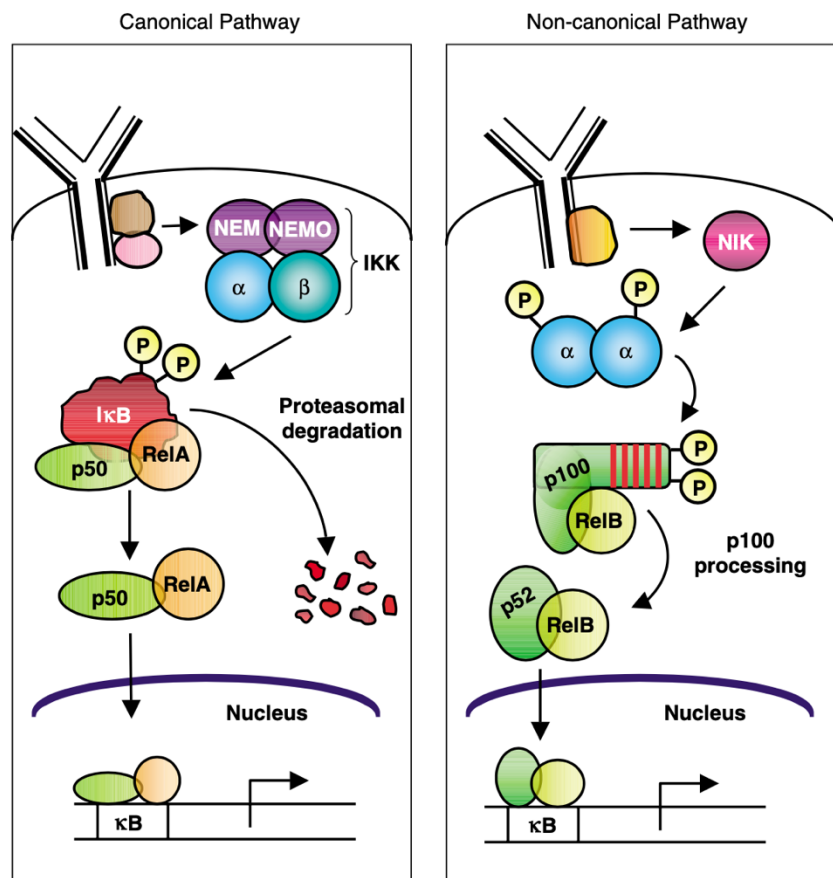
angeborenen Immunantwort sowie in der Apoptose und Zellproliferation durch Regulation der Expression von Zielgenen wie Interleukin-1 (IL-1) und Interferon- $\gamma$  sowie Regulatorproteinen des Zellzyklus (Cyclin D1, D2, D3 und E) und der Apoptose (Proteine der Bcl-2-Familie) (Tergaonkar, 2006, Dolcet et al., 2005). Ein breites Spektrum an Stimuli fungiert als NF $\kappa$ B-Aktivatoren. Zu ihnen zählen Auslöser von zellulärem Stress sowie verschiedenste Zelloberflächenrezeptoren und Wachstumsfaktoren (Tergaonkar, 2006). Die Schnelligkeit des NF $\kappa$ B-Signalweges erlaubt den Zellen eine prompte Reaktion auf Umgebungsstimuli durch Veränderung der Expression von Zielgenen (Dutta et al., 2006). NF $\kappa$ B ist der Oberbegriff für dimere Transkriptionsfaktoren der NF $\kappa$ B/Rel-Familie (Dutta et al., 2006). In Säugetierzellen konnten fünf verschiedene Proteine der NF $\kappa$ B/Rel-Familie identifiziert werden, die sich in zwei Subgruppen einteilen lassen (siehe Abb. 4): Die Rel-Gruppe mit den Mitgliedern RelA (auch p65), RelB und c-Rel zeichnet sich durch ihre C-terminale Transaktivierungsdomäne (TA) aus. Die Mitglieder der NF $\kappa$ B-Gruppe, p105 und p100, werden durch limitierte Proteolyse zu den aktiven Formen p50, bzw. p52 gespalten (Gillmore, 2006). Die Mitglieder beider Gruppen formen Homo- und Heterodimere untereinander und erreichen so eine große Vielfalt an Zielgenen, deren Transkription sie regulieren (Gillmore, 2006).



**Abb. 4: Die fünf Mitglieder der NF $\kappa$ B/Rel-Familie.** Abbildung übernommen von Vinay Tergaonkar („DNA binding units“, (Tergaonkar, 2006)). Die Proteine der NF $\kappa$ B/Rel-Familie zeichnen sich durch die sogenannte „Rel-homology-region“ (RHR) aus. Die RHR enthält eine Kernlokalisierungssequenz („nuclear localisation sequence“, NLS), die die Translokalisierung in den Zellkern ermöglicht und gleichzeitig der Dimerisierung, DNA-Bindung und Interaktion mit inhibitorischen I $\kappa$ B-Proteinen dient (Karin and Ben-Neriah, 2000).

### NF $\kappa$ B-Aktivierung:

Die NF $\kappa$ B-Aktivierung kann über verschiedene Signalwege erfolgen, von denen der kanonische (klassische) Signalweg und der nicht-kanonische (alternative) Signalweg am besten beforscht sind. Während der nicht-kanonische Signalweg vor allem die Aktivierung eines p52/RelB Heterodimers bewirkt, bringt der kanonische Signalweg u.a. den p50/RelA Dimer hervor, welcher der häufigste Vertreter der zellulären NF $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren ist (Gilmore, 2006). In inaktivem Zustand liegen die Transkriptionsfaktoren an inhibitorische I $\kappa$ B-Proteine gebunden im Zytoplasma der Zelle vor. Durch die Bindung der I $\kappa$ B-Proteine wird die Kernlokalisierungssequenz (NLS) der Transkriptionsfaktoren blockiert und die Translokation in den Zellkern verhindert.



**Abb. 5: Schematische Abbildung der NF $\kappa$ B-Signalwege.** Die Aktivierung von NF $\kappa$ B kann über den kanonischen oder nicht-kanonischen Signalweg erfolgen. („NF- $\kappa$ B signal transduction pathways“, Übernommen und modifiziert nach T.D. Gilmore (Gilmore, 2006))

Der kanonische Signalweg fungiert über den Abbau der inhibitorischen I $\kappa$ B-Proteine nach Phosphorylierung durch einen I $\kappa$ B-Kinase (IKK) -Komplex. Die Aktivierung dieses Signalweges erfolgt u.a. nach Stimulation durch TNF-Rezeptoren, Interleukinrezeptoren und T- und B-Zellrezeptoren (Tergaonkar, 2006). Der IKK-Komplex setzt sich aus den katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  (IKK1) und IKK $\beta$  (IKK2) und Dimeren der regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$  (auch genannt „NF $\kappa$ B essential modulator“, NEMO) zusammen. Die Aktivierung erfolgt hierbei durch die Phosphorylierung der Untereinheiten an Serin- oder Threonin-Resten. Der aktivierte IKK-Komplex induziert den Abbau der NF $\kappa$ B-inhibierenden I $\kappa$ B-Proteine, sodass die NF $\kappa$ B-Moleküle anschließend aufgrund ihrer nun freien NLS in den Kern diffundieren können (Karin, 1999). Zusätzlich durchlaufen die NF $\kappa$ B-Proteine Modifikationen wie Phosphorylierung und Acetylierung, die ihnen im Zellkern die Bindung an spezifische Promoter ermöglichen (Tergaonkar, 2006) (siehe Abb. 5). Die Aktivierung von NF $\kappa$ B verläuft bei kontinuierlicher Stimulierung durch wiederholten Abbau und Resynthese von I $\kappa$ B-Proteinen zumeist zyklisch (Gilmore, 2006).

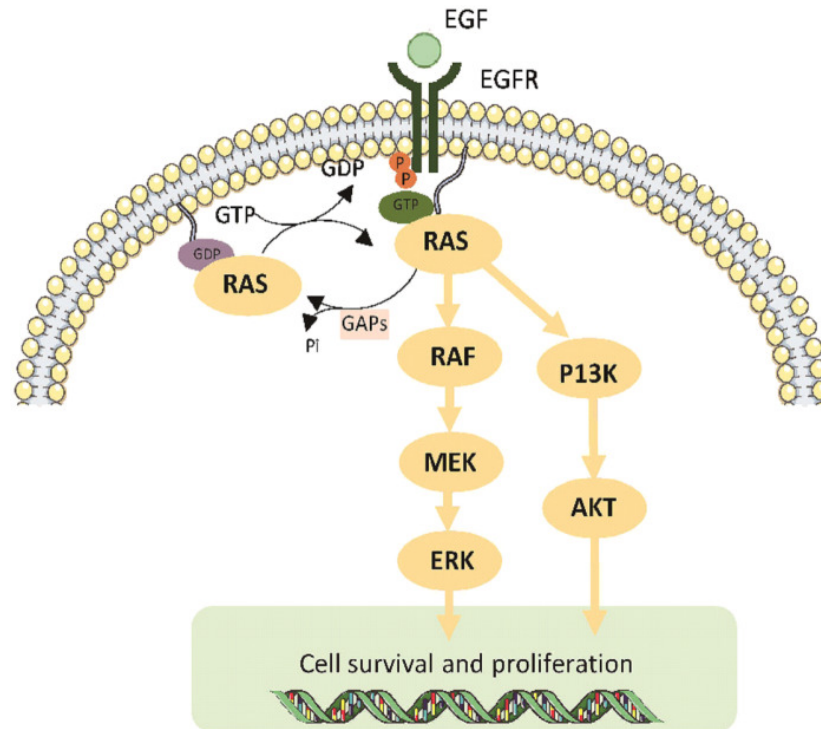
Der nicht-kanonische Signalweg ist essenzieller Bestandteil der Entwicklung lymphoider Organe, für den bisher nur wenige Stimuli identifiziert werden konnten. Zu ihnen zählen Lymphotoxin- $\beta$  (LT $\beta$ ) und B-Zell Aktivierungsfaktor (BAFF). Die Aktivierung des alternativen, lediglich aus IKK $\alpha$  bestehenden IKK-Komplexes, erfolgt hier über die „NF $\kappa$ B-inducing-kinase“ (NIK). Die beiden Signalwege unterscheiden sich in ihren aktivierenden Stimuli, den beteiligten Enzymen und der Zusammensetzung des IKK-Komplexes. (Tergaonkar, 2006). Aufgrund der Beteiligung an einer derart großen Bandbreite zellulärer Prozesse geht die Dysregulation von NF $\kappa$ B mit einer großen Anzahl humaner Pathologien, wie beispielsweise entzündlichen Erkrankungen, Alzheimererkrankungen und auch Krebserkrankungen einher (Tergaonkar, 2006). In verschiedenen Malignomen konnte bereits ein konstitutiv aktivierter NF $\kappa$ B-Signalweg nachgewiesen werden (Dolcet et al., 2005). Als wichtiger Spieler in der Krebsentwicklung und Zellzykluskontrolle ist die potenzielle Beeinflussung des NF $\kappa$ B-Signalweges daher ein zentraler Punkt dieser Forschungsarbeit.

### 1.3.2 EGF-Rezeptor

Der Epidermal growth factor Rezeptor (EGFR) gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und ist als Wachstumsfaktorrezeptor in die Regulation der Zellproliferation und des Zellzyklus involviert. EGFR-Überexpression lässt sich in vielen Tumoren nachweisen, wo sie u.a. beschleunigtes Tumorwachstum, Metastasierung und die Entwicklung von Medikamentenresistenzen fördert (Sabbah et al., 2020).

Der EGFR ist ein Transmembranrezeptor und kann über verschiedene Liganden, wie dem Epidermal growth factor (EGF) und Transforming growth factor ( $\text{TGF-}\alpha$ ) aktiviert werden (Sabbah et al., 2020). Durch Ligandenbindung wird die Homo- und Heterodimerisierung des Rezeptors in Gang gesetzt, welches zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase und Autophosphorylierung führt. Über diesen Prozess können, wie in Abb. 6 dargestellt, zentrale Signalkaskaden wie die RAS/MAPK- (RAS/Map-Kinase), PI3K/Akt- (Phosphoinositid-3-Kinase/Akt) und JAK/STAT-Kaskaden (Januskinase/ signal transducers and activators of transcription) als einige der essenziellen Schaltstellen für Zellwachstum aktiviert werden (Brand et al., 2013). Am Ende dieser Signalkaskaden stehen Transkriptionsfaktoren wie  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , welche die Transkription unterschiedlicher Zielgene im Nukleus steuern (Jiang et al., 2017). Eine EGFR-induzierte  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung geschieht u.a. mithilfe von Kaspase- und Protease-abhängigen Proteinkomplexen (Jiang et al., 2017). Induktion des  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweges über den EGFR führt zur Aktivierung von Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1 und folgender Phosphorylierung des als Tumorsuppressor fungierenden Retinoblastomproteins und kontrolliert so wichtige Knotenpunkte des Zellzyklus (Biswas et al., 2000). Obwohl der EGFR lange Zeit hauptsächlich als Plasmamembranständiger Rezeptor galt, kann durch bestimmte Stimuli seine Internalisierung und der Transport zum Nukleus initiiert werden, wo er als Ko-Transkriptionsfaktor unterschiedlicher Gene fungiert (Brand et al., 2013).





**Abb. 6: Schematische Abbildung der EGFR-Aktivierung.** Die Aktivierung des EGFR setzt verschiedene Signalkaskaden in Gang und steuert Zellüberleben und Proliferation. (Übernommen nach Li et al. (Li et al., 2020))

## 1.4 *Kigelia africana*

### 1.4.1 Grundlagen

Die zur Familie der Trompetenbaumgewächse gehörende *Kigelia africana* (Lam.) Benth. (KA) ist ein bis zu 20 m hoher Baum, der weit verbreitet über den afrikanischen Kontinent und Indien wächst. *Kigelia pinnata* (Jacq.) DC, *Worsboom* und *Balmkheera* sind nur einige der zahlreichen Namen, die diese Pflanze im Laufe der Jahre erhalten hat (Houghton and Jâger, 2002, Saini et al., 2009).

Bekanntheit erlangte die KA durch ihre Früchte, denen sie aufgrund ihrer braunen Farbe und länglichen Form auch den Namen „Sausage Tree“ oder „Leberwurstbaum“ verdankt. Die Früchte erreichen eine beachtliche Länge von 60 cm und haben ein durchschnittliches Gewicht von 4 kg (Saini et al., 2009). Die glockenförmigen Blüten mit einem Durchmesser von bis zu 10 cm haben eine orange-rote, bis violette Farbe (Singh et al., 2018). Die *Kigelia africana* hat eine

lange Geschichte als traditionelle Heilpflanze und wird vor allem in Afrika auch heute noch für die Herstellung medizinischer Heilmittel genutzt. Hierfür werden verschiedenste Bestandteile des Baumes, inklusive der Früchte, Samen, Blätter, Rinde, Wurzeln und Blüten verwendet (Saini et al., 2009, Singh et al., 2018). Diese werden zu Salben, Pulvern, Extrakten und Getränken verarbeitet, die sowohl oral eingenommen werden als auch der äußeren Anwendung dienen. In der traditionellen Medizin werden diese Mittel gegen Erkrankungen des Verdauungstraktes, rheumatische Beschwerden, Psoriasis sowie zur Unterstützung der Wundheilung und für die Hautpflege und als Aphrodisiakum genutzt (Bello et al., 2016). Weitere in der Literatur beschriebene Anwendungsgebiete sind u.a. die Behandlung von sexuell übertragbaren Krankheiten, Pilzkrankungen der Haut, Bandwurminfektionen, gynäkologischen Beschwerden und Hautkrebs (Houghton and Jâger, 2002).

### 1.4.2 Pharmakologisches Potential

Aufgrund des therapeutischen Nutzens der KA in der traditionellen Medizin gibt es bereits unterschiedlichste Belege für das pharmakologische Potenzial dieser Pflanze. Die analgetische, antipyretische, hepatoprotektive, antidiabetische, antiinflammatorische, aphrodisierende und fertilitätssteigernde Wirkung der KA konnte in Tierversuchen nachgewiesen werden und zeigte signifikante und zumeist dosisabhängige Effekte (Singh et al., 2018).

Die antibakterielle und antifungale Aktivität verschiedener Extrakte wurde im Vergleich mit gängigen Antibiotika getestet und ergab signifikante Wirkung vor allem gegen Gram-positive Erreger (Singh et al., 2018). Dies belegt den traditionellen Nutzen der Pflanze zur Unterstützung der Wundheilung sowie für verschiedene bakterielle und fungale Infektionen. Die nachgewiesene hepatoprotektive Wirkung bei Mäusen mit Leberschaden basiert vermutlich auf der antioxidativen Eigenschaft von KA-Bestandteilen (Olaleye and Rocha, 2008). Die von Singh et al. (2018) beschriebenen antidiabetischen Effekte konnten bereits in weiteren Studien nachgewiesen werden: Aus *Kigelia africana* hergestellte Extrakte zeigten eine deutliche Senkung des Blutzuckerspiegels bei diabetischen Mäusen, sowie gesenkte Cholesterin- und Triglyceridwerte (Kumar et al., 2012, Njogu et al., 2018). Verschiedene pharmakologische

Untersuchungen liefern zusätzliche Nachweise für die antiinflammatorische, analgetische, antioxidative und die antikanzerogene Wirkung der verschiedenen Bestandteile der *Kigelia africana* (Bello et al., 2016). In den letzten Jahren ist das Interesse an der *Kigelia africana* auch in der Kosmetikbranche gewachsen (Bello et al., 2016). Gründe hierfür könnten der traditionelle Nutzen der Pflanzenextrakte mit dermatologischer Anwendung und die antiinflammatorischen Effekte der Pflanze sein.

### 1.4.3 Antineoplastische Wirkung

Ein besonderes Interesse in der Krebsforschung weckte die traditionelle Behandlung von Hautkrebs mit Extrakten der *Kigelia africana* (Singh et al., 2018, Higgins et al., 2010). KA-Rinden-Extrakt übte einen signifikanten, inhibitorischen und dosisabhängigen Effekt auf verschiedene Melanomzelllinien aus (Houghton et al., 1994). Die *in vitro* Zytotoxizität der KA gegen Melanomzelllinien und andere Tumorzelllinien konnte inzwischen durch weitere Studien belegt werden (Higgins et al., 2010, Jackson et al., 2000). Auch andere onkologische Studien befassen sich mit der antineoplastischen Wirkung von *Kigelia africana* bei verschiedenen Krebserkrankungen. Unter Behandlung mit aus KA-Samen gewonnenem Öl konnte das Zellwachstum von Kolon-Adenokarzinomzellen und humanen embryonalen Nierenzellen dosisabhängig gehemmt werden, ohne dass ein vermehrter Zelltod auftrat (Chivandi et al., 2012). Es ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Wachstumshemmung der tumoralen Zellen und der Hemmung der nichttumoralen Nierenzellen feststellen (Chivandi et al., 2012). In 2016 gelang der Nachweis, dass mittels KA-Fruchtextrakten die Apoptose von humanen Kolonkarzinom-Zellen (HCT116-Zellen) *in vitro* ausgelöst werden konnte (Guon and Chung, 2016). Auch in der Brustkrebsforschung wurde man bereits auf die vielversprechenden Wirkungen der *Kigelia africana* aufmerksam. Einige Bestandteile eines aus den KA-Früchten gewonnenen Extraktes zeigten proliferationshemmende Wirkungen auf MCF-7 Brustkrebszellen (Yani et al., 2018). Zuletzt gelang der Nachweis, dass die Behandlung mit KA-Extrakten die Proliferation von Neuroblastomzellen im Stadium 4 hemmt und deren Apoptose induziert (Ahrens et al., 2022).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Das Neuroblastom ist eine der relevantesten malignen Erkrankungen des Kindesalters. Kinder in der Hochrisikogruppe erwartet eine intensive, multimodale Therapie und eine immer noch erschreckend ungünstige Prognose. Die Entwicklung alternativer Therapieansätze bleibt daher von größter Bedeutung für die Betroffenen. Das medizinische Potential der *Kigelia africana* ist unter indigenen Völkern bereits seit Jahrhunderten bekannt und geschätzt. Diese Arbeit befasst sich mit der potenziell antineoplastischen Wirkung eines *Kigelia africana* Fruchtextraktes auf Neuroblastomzellen des Stadiums 3. Auf molekularer Ebene lassen sich u.a. NF $\kappa$ B-, EGFR- und GD2-Expression als einige wichtige Treiber der Malignität im NB identifizieren. Diese Neuroblastom-assoziierten Rezeptoren und Oberflächenmoleküle sowie die Beeinflussbarkeit ihrer Expression spielen eine zentrale Rolle in dieser Forschungsarbeit. Besonderes Interesse galt der Untersuchung der Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion in Tumorzellen und dem Vergleich mit nichtneoplastischen Zellen. Dafür wurden die Vitalität und die Apoptose verschiedener Zelllinien mittels Biolumineszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Um die potenzielle Rolle von NF $\kappa$ B als Wirkungsmechanismus in KA-behandelten Tumorzellen zu evaluieren, wurden Western Blots durchgeführt. Die Lokalisierung von p65, EGFR und GD2 wurde durch Immunfluoreszenz visualisiert. Um eine mögliche Beeinflussung der Prozesse der MYCN-Regulation in den Tumorzellen zu evaluieren, wurden für diese Arbeit Tumorzelllinien mit unterschiedlichem MYCN-Amplifikationsstatus ausgewählt.

Diese Arbeit soll neue Informationen über die komplexe Wirkungsweise der *Kigelia africana* liefern und ihre Wirkung auf Neuroblastomzellen im Stadium 3 beurteilen. Die gewonnenen Einblicke könnten helfen die Forschung an supportiven Therapieoptionen für Neuroblastome voranzutreiben, die trotz intensiver Therapie weiterhin durch Immunevasion, Verbleib residualer Tumorzellen und Ausbildung von Therapieresistenzen eine große Behandlungsherausforderung darstellen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Laborgeräte

GERÄT	HERSTELLER
Biofuge stratos	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Centrifuge 5430 R	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5804 R	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5810	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Elektrophoreskammer (Mini-Protean Tetra System)	Bio-Rad Laboratories (Kalifornien, USA)
FlexStation® 3, Multi-Mode Microplate Reader	Molecular Devices (Kalifornien, USA)
MCO-19AIC(UV)-PE Brutschrank	Panasonic (Tokyo, Japan)
Medical Film Processor SRX-101A	Konica Minolta Medical & Graphic Inc. (Tokyo, Japan)
Olympus IX50 Mikroskop	Olympus SE (Hamburg, Deutschland)
PowerPac 1000 Electrophoresis Power Supply	Bio-Rad Laboratories (Kalifornien, USA)
Schüttelwasserbad 1083	GFL Technology (Burgwedel, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)

**Tabelle 1: Genutzte Laborgeräte**

(Alle Geräte wurden am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf verwendet.)

#### 3.2 Verbrauchsmaterialien

MATERIAL	HERSTELLER
Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5ml, 2ml)	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)

Flow Cytometry Tubes (5ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Nitrilhandschuhe (Gr. S)	Ansell (Yarra City, Aus)
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Polypropylenröhrchen für FACS (5ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TC-Schale 100	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturplatten (6-Well, 12-Well, 96-Well)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One (Frickenhäusen, Deutschland)

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

### 3.3 Bearbeitungs- & Auswertungsprogramme

NAME	HERSTELLER / ENTWICKLER
Axiovision (Version 4.8.2)	Carl Zeiss AG, DE
Freeform (Version 1.2)	Apple Inc., USA
FACSDiva Software	BD Biosciences, USA
GraphPad Prism (Version 8.2.1)	GraphPad Software Inc., USA
Image J (Version 1.53t)	Wayne Rasband and National Institutes of Health, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, USA

**Tabelle 3: Auswertungsprogramme**

### 3.4 Puffer und Lösungen

NAME	INHALTSSTOFFE
Elektrophoresepuffer	- 100 mL 10x Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad Laboratories)
	- 900 mL ddH <sub>2</sub> O
	- 1 % BSA
IF-Blockierungspuffer	- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Gibco, ThermoFisher Scientific)

IF-Waschpuffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DPBS</li> <li>- 0,5 % Bovine Serum Albumin (BSA) (Life Science, Sigma Aldrich/MERCK)</li> <li>- 0,05% Tween 20 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)</li> <li>- 50 mL RIPA-Buffer (Life Science, Sigma Aldrich/MERCK)</li> </ul>
Lysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)</li> </ul>
Proteinstandard für Bradford-Test	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 mg BSA in 5 mL RIPA-Buffer</li> <li>- Lysepuffer (Menge anhand Verdünnungsreihe)</li> </ul>
Stripping-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 62,5 mL 1M Trizma-Base Lösung</li> <li>- 100 mL 20% SDS (Sigma Life Science, Sigma-Aldrich/MERCK)</li> <li>- 7 mL <math>\beta</math>-Mercaptoethanol (MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn)</li> <li>- ddH<sub>2</sub>O (Ad. 1 L)</li> </ul>
(10x) Tris-Buffered Saline-Puffer (TBS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 60,5 g Trizma-Base Primary Standard and Buffer (Sigma-Aldrich/MERCK)</li> <li>- 87 g NaCl (Sigma-Aldrich/MERCK)</li> <li>- HCl 25 % (Chemsolute, Th. Geyer, Renningen) zur pH-Einstellung zwischen 7,3-7,4</li> <li>- ddH<sub>2</sub>O (Ad. 1 L)</li> </ul>
(1x) Tris-Buffered Saline - Tween (TBST 0,05%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 L TBS</li> <li>- ddH<sub>2</sub>O (Ad. 10 L)</li> <li>- 5 mL Tween 20 %</li> </ul>
1M Trizma-Base-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 12,114 g Trizma-Base Primary Standard and Buffer (Sigma-Aldrich/MERCK)</li> <li>- HCl 25% zur pH-Einstellung bei 6,8</li> <li>- ddH<sub>2</sub>O (Ad. 100 mL)</li> </ul>
WB-Blockierungspuffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5% Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad Laboratories, USA) in TBST 0,05%</li> </ul>
WB-Probenpuffer nach Laemmli	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\beta</math>-Mercaptoethanol</li> <li>- 4x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, USA)</li> <li>- Verhältnis 1:10</li> </ul>

**Tabelle 4: Inhaltsstoffe und Hersteller der genutzten Puffer und Lösungen**

### 3.5 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendete LS-Zelllinie stammt von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Die verwendete LS-Zelllinie war im Sinne eines Reportergens zusätzlich mit dem Luciferase-Gen transduziert (LS-luc). Lediglich die Immunfluoreszenzversuche wurden mit LS-Zellen ohne die Reportergen-Transduktion durchgeführt, um die Fluoreszenzsignale nicht zu verfälschen (LS-Only). Die NB69-Linie stammt aus der European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) und die CCD-1064Sk Fibroblasten aus der Zellbank der American Type Culture Collection (ATCC).

In Tabelle 5 wurden Informationen zu den verwendeten Zelllinien inklusive Informationen zu Zelltyp, Ursprung, Tumorstadium, N-Myc-Gen Amplifikationsstatus und zum verwendeten Kulturmedium aufgelistet. Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei konstanten 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Kultivierungsmedien wurden Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), oder Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI) verwendet. Beide Medien stammen von Gibco (ThermoFisher Scientific, USA) und wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit fetalem Kälberserum (FCS) von Gibco (ThermoFisher Scientific, USA) und 1% Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep, Gibco, ThermoFisher Scientific, USA) versetzt (enthält 10.000 Units/mL Penicillin und 10.000 µg/mL Streptomycin). Für die Selektion der LS-Zelllinie mit Luciferase-Gen wurde bei diesen Zellen zusätzlich 0,1% Doxycyclin hinzugefügt. Hierfür wurde Doxycyclin-hyclate (Sigma-Aldrich/MERCK, USA) nach Herstellerangaben in destilliertem Wasser gelöst. Die Zellkulturarbeit erfolgte stets unter sterilen Bedingungen, um Kontaminationen zu verhindern. Die Lösung der adhärennten Zellen bei der Subkultivierung sowie in den durchgeführten Versuchen erfolgte mittels der Trypsin-EDTA-Lösung von Sigma-Aldrich/Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland). Für die Immunfluoreszenz wurde hierfür die Accutase Cell Detachment Solution von Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund, Deutschland) verwendet.



<b>Zelllinie</b>	<b>LS</b>	<b>NB69</b>	<b>CCD-1064-SK</b>
<b>Anbieter, Katalognummer</b>	DSMZ, ACC 6E75	ECACC, 99072802	ATCC, CRL-2076
<b>Zelltyp</b>	Neuroblastom, Abdomen	Neuroblastom, Gehirn	Fibroblasten, Haut
<b>Ursprung</b>	Human, weiblich, 16 Monate	Human, männlich, 16 Monate	Human, männliches Neugeborenes
<b>Tumorstadium</b>	3	3	(Nichttumorales Gewebe)
<b>MYCN- Amplifikation</b>	+	-	-
<b>Kulturmedium</b>	RPMI 1640	RPMI 1640	IMDM
<b>Mediumzusätze</b>	10% FCS 1% Pen/Strep 0,1% Doxycyclin*	15% FCS 1% Pen/Strep	10% FCS 1% Pen/Strep

**Tabelle 5: Informationen zu den verwendeten Zelllinien**

(\*Bei der LS-Zelllinie mit Luciferase-Gen-Transduktion)

### 3.6 *Kigelia africana* Extrakt

Für die Behandlung der Zelllinien wurde der aus den Früchten der KA hergestellte Extrakt der Stockmeier GmbH & Co. KG (Bielefeld, Deutschland) genutzt. Der Fruchtextrakt enthält 65% Propandiol als Lösungsmittel. Um die Wirkung des enthaltenen Alkohols auf die behandelten Zellen von der Wirkung des Fruchtextrakts unterscheiden zu können, erfolgte vor jedem Experiment die Herstellung einer 65-prozentigen Propandiol-Kontrolllösung. Hierfür wurden reines 1,2-Propandiol von Sigma-Aldrich/Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und DPBS vermischt. Im Folgenden wird diese 65%-Lösung einfachheitshalber als Propandiol oder „Prop.“ abgekürzt. Die Behandlung der Zellen mit der Kontrolllösung erfolgte zeitgleich zur Behandlung mit dem KA-Extrakt, sowie in den gleichen Verdünnungen.

Der in dieser Arbeit genutzte Fruchtextrakt wurde durch eine Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie auf bestimmte Inhaltsstoffe analysiert. Die Analyse erfolgte mithilfe eines an ein Qtrap 5500

Linear ion trap quadrupole LC/MS/MS Massenspektrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) gekoppelten 1260/1290 Infinity Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Die Messung wurde im negativen Ionen Modus mittels Elektrosprayionisation bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 400 µl/min und 40°C durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mittels der Analyst 1.6.3. und der Multiquant 3.0.2. Software (beide von Sciex, Framingham, MA, USA). Die Analysedaten des Fruchtextraktes wurden freundlicherweise von Ahrens et al. (2022) bereitgestellt.

### 3.7 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl vor der Aussaat in Wellplatten oder Petrischalen erfolgte lichtmikroskopisch mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Tote Zellen wurden mittels Tryphanblau von Gibco (ThermoFisher, USA) angefärbt und von der Zählung ausgeschlossen. Die Berechnung der Zellzahl in der Zählkammer erfolgte nach folgender Formel:

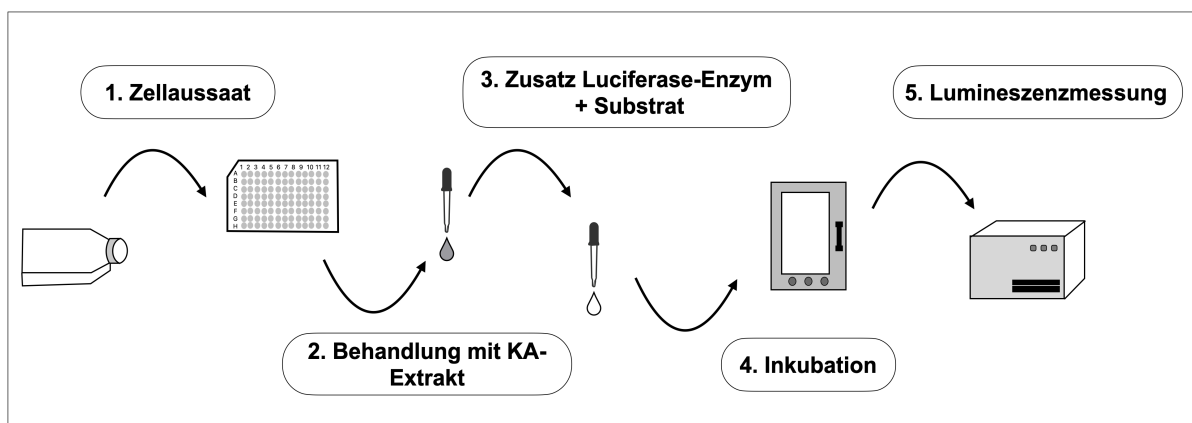
$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} \times 10^5$$

### 3.8 Vitalitätsmessung nach *Kigelia africana* Exposition

Die Zellvitalität wurde quantitativ mit dem „RealTime-Glo MT Cell Viability Assay“ von Promega (Walldorf, Deutschland) bestimmt. Die Messung erfolgte mittels eines Mikroplattenreaders (FlexStation® 3, Multi-Mode Microplate Reader von Molecular Devices, CA, USA) und der SoftMax Pro 5.4.6. Software (beides von Molecular Devices, Kalifornien, USA). In diesem Versuch wurde das Überleben der Neuroblastomzellen und nichtneoplastischen CCD-1064-SK Zellen nach Behandlung mit dem KA-Extrakt mithilfe von Biolumineszenz gemessen. Durch die Zugabe des Luciferaseenzym und eines Prosubstrates wird der Metabolismus und somit die Viabilität der Zellen quantifiziert. Lebendige Zellen reduzieren das zugegebene Prosubstrat zu einem Substrat für die Luciferase, welche dann ein lumineszentes Signal erzeugt. Die Stärke der Lumineszenz ist proportional zu der Menge an lebendigen Zellen.

Der Versuch diente der Bestimmung und Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung des KA-Extraktes auf die verschiedenen Zelltypen. Die drei Zelllinien wurden mit verschiedenen Verdünnungen des KA-Extraktes oder der Propandiollösung (Prop.) behandelt. Folgende Konzentrationen des Fruchtextraktes wurden genutzt: 8 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml. Analog hierzu wurden Verdünnungen der Propandiol-Lösung verwendet. Zusätzlich erfolgte als Kontrolle die Messung des lumineszenten Signals von Zellen ohne Behandlung, sowie die Messung des Signals des reinen Kulturmediums ohne Zellen, als Negativkontrolle.

Abbildung 7 zeigt die Abfolge der unterschiedlichen Schritte der Versuchsdurchführung. Die Zählung und Aussaat der Zellen erfolgten an Tag 1 in sterilen 96-Well-Platten. Die Menge der Zellen pro Well betrug  $9 \times 10^5$  Zellen in je 50  $\mu$ l Medium. An Tag 2 erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem KA-Extrakt und Prop. in verschiedenen Verdünnungen. Zu jedem Well wurden zudem die Assay-Bestandteile NanoLuc Enzyme und MT Cell Viability Substrate, zu gleichen Teilen gelöst im jeweiligen Zellkulturmedium, hinzugefügt. Die Messung am Mikroplatten-Reader erfolgte in der 96-Well-Platte bei 37 °C zu den Zeitpunkten 0 h (direkt nach der Behandlung), sowie 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung. Zwischen den Messzeitpunkten erfolgte die Inkubation der Wellplatten im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Belegung der 96-Well-Platte wurde in Triplikaten durchgeführt.



**Abb. 7: Schematische Versuchsdarstellung der Vitalitätsmessung.**

### 3.9 Durchflusszytometrie der GD2-Expriemierung und Apoptose

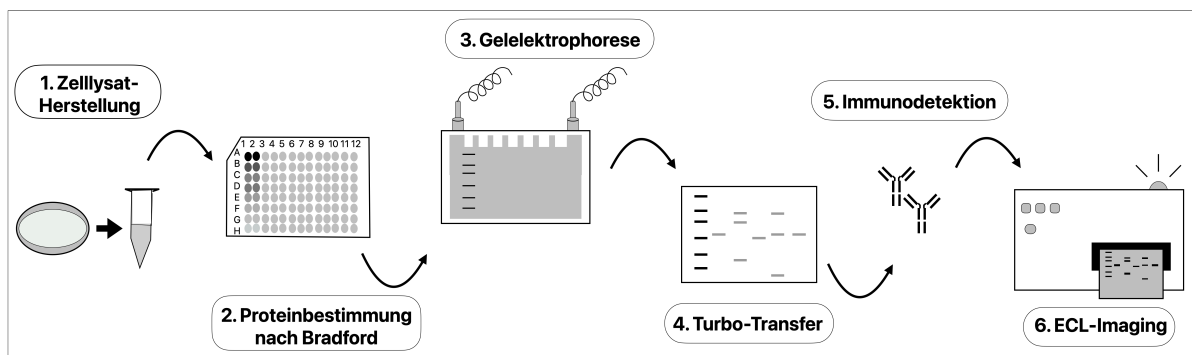
Um die Induktion der Apoptose bei Tumorzellen durch die Behandlung mit *Kigelia africana* zu quantifizieren, wurde die Durchflusszytometrie genutzt. Als Apoptosemarker diente die Propidiumjodid staining solution (PI) (BD Biosciences, USA). Die Propidiumjodidfärbung diente als Nukleinsäurefärbung der Unterscheidung von lebendigen und toten Zellen. Da PI membranundurchlässig ist, wurde es von lebendigen Zellen nicht aufgenommen, während die durchlässige Zellmembran toter Zellen die PI-Bindung an Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) erlaubte.

Zusätzlich wurde auch die Expression des Disialogangliosid GD2 mittels GD2-Antikörper (BD OptiBuild™ BV711 Mouse Anti-Human GD2 Klon: 14.G2a, BD Biosciences, USA) auf der Zelloberfläche gemessen. Die Messungen erfolgten nach Färbung der Zellen 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung mit Medium (unbehandelte Kontrolle), Propandiol oder KA am Durchflusszytometer (FACS). Hierfür wurden an Tag 1  $1 \times 10^5$  Zellen der jeweiligen Zelllinie in 2 ml Medium in sterilen 6-Well-Platten ausgesät. An Tag 2 erfolgte die Behandlung der Zellen mit 4 mg/ml KA, bzw. Prop. oder Medium als Kontrolle. Die FACS-Analysen folgten an Tag 3 bis 5 zur selben Zeit für die Messzeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung. Die behandelten Zellen wurden bis zu den Messungen im Brutschrank inkubiert. Vor jeder FACS-Analyse wurde das Medium mit den apoptotischen Zellen aus den Wells in FACS-Probenröhrchen überführt. Die adhärenen Zellen wurden mit Trypsin-EDTA-Solution (von Sigma-Aldrich, USA) aus den Wells gelöst, ebenfalls in das Röhrchen überführt und anschließend durch Zentrifugation mit 1400 rpm für 5 Minuten bei 4 °C pelletiert. Daraufhin erfolgte die Resuspendierung in 1 ml gekühltem DPBS. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in je 100 µl AutoMACS Rinsing Solution (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) resuspendiert und mit je 1 µl PI und 3 µl GD2-Antikörper pro Röhrchen gefärbt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln wurden weitere 400 µl AutoMACS Solution hinzugegeben. Die anschließende Messung erfolgte am LSR Fortessa Durchflusszytometer. Der BV711-gekoppelte GD-Antikörper wurde bei 405 nm, PI bei 561 nm und das FITC-Signal (Fluoresceinisothiocyanat) der Luciferase-

transduzierten LS-Zelllinie zusätzlich bei 488 nm gemessen. Die Datenerfassung erfolgte mit der FACSDiva Software (von BD Biosciences, New Jersey, USA).

### 3.10 Proteinnachweis mittels Western Blot

Um den potenziellen Einfluss von *Kigelia africana* auf die Expression bestimmter NF $\kappa$ B-Pathway Proteine zu analysieren, wurden Gesamtzelllysate aus sowohl KA-, Prop. und unbehandelten Zellen hergestellt und Western Blots (WB) durchgeführt. Western Blots sind eine molekularbiologische Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung bestimmter Zielproteine in Proben. Hierfür war ein mehrstufiges Verfahren mit Herstellung von Zelllysaten, Proteinbestimmung und anschließender Gelelektrophorese notwendig, welches in Abbildung 8 bildlich dargestellt ist. Die Western Blots wurden mit den Zelllysaten aller drei Zelllinien durchgeführt.



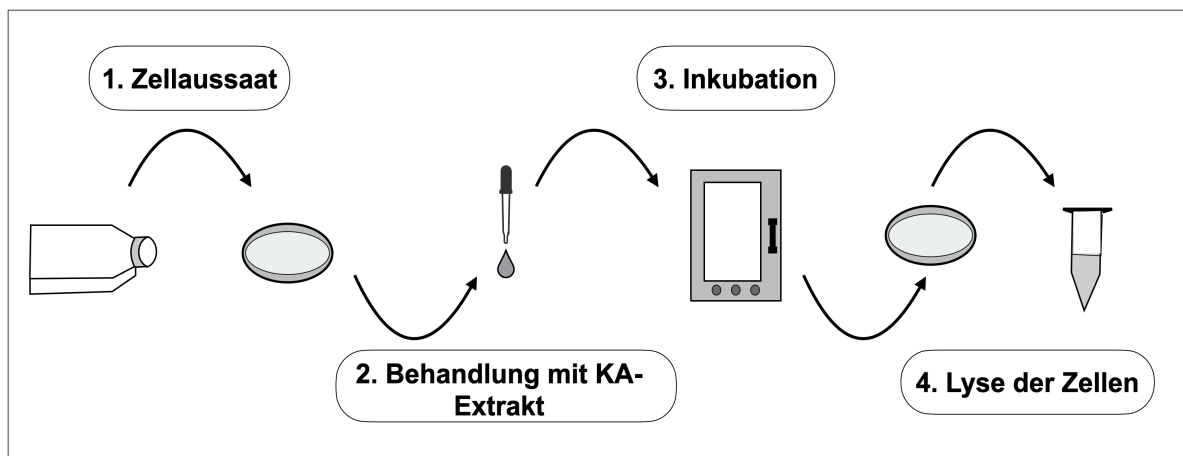
**Abb. 8: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte für den Nachweis der Proteinexpression mittels Western Blot.**

#### 3.10.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Um die Proteinexpression von mit KA-Extrakt behandelten Zellen mittels Western Blot analysieren zu können, erfolgte zunächst die Herstellung von Gesamtzelllysaten. Die einzelnen Schritte dieses Verfahrens sind in Abbildung 9 dargestellt. An Tag 1 erfolgte zunächst die Zählung und Aussaat der Zellen in sterilen Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm. Die CCD-1064Sk Zellen wurden in einer Menge von  $10 \times 10^5$  Zellen, die LS und die NB69 Zellen aufgrund der geringeren Zellgröße mit  $20 \times 10^5$  Zellen in jeweils 7,7015 ml Zellkulturmedium ausgesät. Die Kultivierung fand im Brutschrank bei 37 °C und

5% CO<sub>2</sub> statt. An Tag 2 erfolgte die Behandlung der Zellen mit KA-Extrakt, Propandiol oder reinem Zellkulturmedium als Kontrolle, durch Zugabe in die jeweiligen Petrischalen. Die Konzentration des KA-Extraktes in den Petrischalen betrug 7,5 mg/ml.

Die Herstellung der Zelllysate erfolgte zu den Zeitpunkten 0 h (ohne vorherige Zugabe von KA-Extrakt, Prop. oder Medium), sowie 30 min, 60 min, 24 h, 48 h, und 72 h nach Behandlung. Die adhärennten Zellen wurden trypsinisiert und mittels Zentrifugation mit 1400 r.p.m. für 5 Minuten bei 4 °C pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml kaltem DPBS resuspendiert und erneut mit 1400 r.p.m. für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Überschüssiges DPBS wurde daraufhin verworfen und das verbliebene Zellpellet mittels Lysepuffer lysiert und in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Die Lösung wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert und daraufhin für 10 Minuten bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Suspension in ein neues gekühltes Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur WB-Durchführung bei -20 °C, bzw. bei längerer Lagerzeit bei -80 °C gelagert.



**Abb. 9: Schematische Versuchsdarstellung der Gesamtzelllysate-Herstellung.**

### 3.10.2 Proteinbestimmung der Gesamtzelllysate

Die Proteingehalte der Zelllysate wurden mittels Bradford-Test anhand einer Proteinstandard-Verdünnung ermittelt. Hierbei handelt es sich um die kolorimetrische Messung der Proteinkonzentration in Proben. Dabei wird das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblau-Farbstoffes durch die Proteinbindung verschoben. Es entsteht ein Farbumschlag von rot zu blau, abhängig von der Menge an enthaltenen Aminosäuren in der Probe. Für die

benötigte Protein-Standardkurve wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mittels BSA, gelöst im Lysepuffer, durchgeführt. Für die Versuchsdurchführung wurde das verwendete Protein Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories) im Verhältnis 1:4 mit destilliertem Wasser versetzt. In einer 96-Well-Platte wurden 2 µl Lysat bzw. Proteinstandard mit je 200 µl des verdünnten Protein Dye Reagent Concentrates vermischt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgte die Messung am Mikroplatten-Reader mithilfe des SoftMax Pro Programms bei 595 nm und Raumtemperatur. Die Messung in der 96-Well-Platte wurde in Triplikaten durchgeführt. Anschließend wurde anhand der Messwerte und der Proteinstandard-Verdünnungskurve die Proteinkonzentration der Zelllysate berechnet.

### 3.10.3 Western Blot Durchführung

Um gezielt einzelne Proteine in Proben (z.B. Zelllysaten) nachweisen zu können, werden beim Western Blot die Proben mittels Gelelektrophorese anhand ihrer Molekülgröße und Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt. Anschließend können die Proteine aus dem Gel auf eine feste Membran übertragen werden (sog. „Blotting“), auf der sie dann mittels zweistufiger Antikörper-Inkubation (Immunodetektion) nachgewiesen werden können. Die Antikörper-Komplexe auf der Membran können anschließend mittels Chemilumineszenzverfahren sichtbar gemacht werden.

Zur Vorbereitung für die Gelelektrophorese wurden zunächst die Zelllysate bei Raumtemperatur in einer Eiswanne aufgetaut und der 4x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories) in einem Verhältnis von 10:1 mit β-Mercaptoethanol (MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn) versetzt. Für die Gelelektrophorese wurden die Gele mit je 15 µl Probenvolumen pro Lane beladen. Für die Probenvorbereitung wurden pro Lane 3,752 µl Laemmli-β-Mercaptoethanol-Puffer mit einer je nach Proteingehalt variierenden Menge Lysatvolumen vermischt, und mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 15 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Diese Proben wurden anschließend für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und denaturiert, bevor sie für die Elektrophorese in die Geltaschen pipettiert wurden. Die Geltaschen wurden mit je 15 µl Probenvolumen pro Lane beladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Tris-Glycin-Gelen (Konzentration 4-15%)

(Mini-Protean TGX Precast Gels, Bio-Rad Laboratories) mithilfe des Mini-Protean Tetra Elektrophoresesystems von Bio-Rad. Der Laufpuffer für die Elektrophoresekammer (10x Tris/Glycine/SDS Buffer von Bio-Rad Laboratories) wurde vor der Elektrophorese mit destilliertem Wasser verdünnt. Als Proteinstandard wurde hier die „Prestained Protein Ladder“ von Abcam (Cambridge, UK) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 300 V. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels eines Trans-Blot Turbo Transfer-Systems auf Nitrocellulose-Membranen (Transblot Turbo Transfer Pack, beides von Bio-Rad Laboratories) übertragen. Anschließend wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% Blockierungspuffer geblockt.

Die anschließende Primärantikörper-Inkubation erfolgte auf einem Wipptisch über Nacht bei 4 °C, die Sekundärantikörper-Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde, ebenfalls auf einem Wipptisch. Die für die Antikörperinkubation genutzten Antikörper (AK) sind in Tabelle 6 aufgeführt. Primärantikörper wurden in 0,05% TBST mit 5% BSA gelöst, Sekundärantikörper in reinem 0,05% TBST. Als Ladekontrolle diente Cyclophilin A. Die Immunodetektion erfolgte durch verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence, ECL) über den Nachweis von Peroxidase-Aktivität der HRP-konjugierten Antikörper. Hierfür wurde das SuperSignal West Femto System von ThermoFisher-Scientific genutzt. Der entsprechende Peroxide Buffer wurde im Verhältnis 1:1 mit der Luminol/Enhancer-Lösung versetzt, und dann auf die Membran aufgetragen. Die Entwicklung der Chemilumineszenz-Signale erfolgte mittels Filmentwickler auf CL-XPosure (ThermoFisher-Scientific) und Fuji Super RX-N Filmen (Fujifilm Corporation, Tokyo) in einer Dunkelkammer.

Um auf den Membranen mehrfach Proteine nachweisen zu können (phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Formen von NF $\kappa$ B und NEMO), wurden sie mit Stripping-Puffer von den AK-Bindungen befreit. Hierfür wurden die Membranen für 45 Minuten bei 60 °C im Schüttelwasserbad im Stripping-Puffer eingelegt, und anschließend mehrmals gewaschen. Daraufhin konnten die Membranen erneut in 5% Blockierungspuffer geblockt werden und mit neuen Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert werden. Als Waschpuffer während der Western Blot Durchführung und zur Lagerung der Western Blot Membranen diente TBST 0,05%.



<b>Antikörper (AK)</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Primär/ Sekundär</b>
<b>Phospho-IKK<math>\gamma</math> (Ser 376)</b>	Rabbit, polyklonal	Cell Signaling Technology, (Massachusetts, USA)	1:1000	Primär-AK
<b>Anti-IKK gamma/NEMO</b>	Rabbit, monoklonal	Abcam (Cambridge, UK)	1:10.000	Primär-AK
<b>pNF<math>\kappa</math>B p65 (S536)</b>	Rabbit, monoklonal	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)	1:1000	Primär-AK
<b>Anti-NF<math>\kappa</math>B p65</b>	Rabbit, polyklonal	Abcam (Cambridge, UK)	1:10.000	Primär-AK
<b>Cyclophilin A</b>	Rabbit	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)	1:20.000	Primär-AK
<b>Goat-anti- Rabbit IgG (HRP)</b>	Goat, HRP- Konjugated	Antikörper Online, (Aachen, Deutschland)	1:10.000	Sekundär-AK

Tabelle 6: Primär- und Sekundärantikörper für Western Blots

### 3.11 Immunfluoreszenz

Um die Expression verschiedener Tumormarker und Signalmoleküle darzustellen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Die Neuroblastomzellen wurden mit  $1 \times 10^5$  Zellen und die Hautfibroblasten mit  $5 \times 10^4$  pro Well in 1 ml Medium auf Coverslips (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Deutschland) in 12-Well-Platten ausgesät. In diesem Fall wurde Accutase Cell Detachment Solution (von Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland) statt Trypsin für die Aussaat der Zellen in die 12-Well Platten benutzt, um die Oberflächenmoleküle nicht zu beschädigen. Für diesen Versuch wurden LS-Zellen ohne Luciferase-Gen-Transduktion genutzt, um das FITC-Signal der Antikörperbindung nicht zu verfälschen (LS-Only).

Am Folgetag erfolgte die Behandlung mit 1 mg/ml KA bzw. Propandiol. Die Zellen ohne Behandlung erhielten je dieselbe Menge an Kulturmedium. Die Fixierung der Zellen erfolgte direkt nach der Behandlung (0 h) und 24 h nach Behandlung. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit gekühltem DPBS erfolgte die

Fixierung mit auf -20 °C gekühltem, 99% Methanol (Chemsolute, Th. Geyer, Renningen). Anschließend wurden die Well-Platten mit einem Deckel und Parafilm verschlossen und bis zur Immunfluoreszenzfärbung bei -20 °C gelagert. Vor der Antikörperfärbung wurden die Zellen zwei Mal für 5 Minuten auf einem Wipptisch mit DPBS gewaschen und anschließend 1 h mit Blockierungs-Puffer (1% BSA in DPBS) behandelt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Anschließend erfolgte bei 4 °C und über Nacht die Inkubation mit dem ersten Antikörper, verdünnt in Waschpuffer. Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 7 dargestellt. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimalig für 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde lichtgeschützt und bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Färbung von GD2 und NFκB wurde als Sekundärantikörper der Donkey-anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor 647-Signal) und für die Färbung von EGFR und pNFκB p65 wurde der Sekundärantikörper Goat-anti-Rabbit IgG H&L (FITC-Signal) (beide von Abcam, Cambridge, UK) verwendet. Nach der Inkubation erfolgten mehrere Waschschrte (2x 5 min in Waschpuffer, 2x 5 min in DPBS, 1x 5 min in ddH<sub>2</sub>O). Zur Zellkernfärbung diente DAPI (4',6-Diamindin-2-phenylindol) als DNA-Interkalator. Die Zellen wurden hierfür 5 Minuten mit 1 µl/ml DAPI (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt und zuletzt mit Fluoromount G (SouthernBiotech, AL, USA) eingedeckt. Mikroskopiert wurde am Zeiss Axiovert 200M von der UKE Microscopy Imaging Facility mit der Software Axiovision 4.8.2 (Carl Zeiss AG, Deutschland).

Zielmolekül	Antikörper	Hersteller	Isotypkontrolle	Verdünnung
<b>Primärantikörper</b>				
<b>GD2</b>	Purified Mouse Anti-Human Disialoganglioside GD2 (BD554272)	BD Biosciences (NJ, USA)	Purified Mouse IgG2a, κ Isotype Control RUO, BD Bioscience	1:150

<b>EGFR</b>	Recombinant Anti-EGFR antibody [E114] (ab32562)	Abcam (Cambridge, UK)	Recombinant Rabbit IgG, monoclonal [EPR25A] - Isotype Control (ab172730), Abcam	1:100
<b>NFκB p65</b>	Monoclonal RELA / NFκB p65 Antibody (LS-C413576)	LSBio (WA, USA)	Negative Control Mouse IgG1, (X0931) Dako	1:100
<b>pNFκB p65</b>	Anti-pNF-κB p65 (phospho S536) antibody (ab86299)	Abcam (Cambridge, UK)	Rabbit IgG, polyclonal (ab37415), Abcam	1:250
<b>Sekundärantikörper</b>				
<b>Donkey-anti-Mouse IgG H&amp;L</b>	Donkey-anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor 647) (ab150107)	Abcam (Cambridge, UK)	/	1:200
<b>Goat-anti-Rabbit IgG H&amp;L</b>	Goat-anti-Rabbit IgG H&L (FITC) (ab97050)	Abcam (Cambridge, UK)	/	1:200

**Tabelle 7: Antikörper für die Immunfluoreszenz**

### 3.12 Statistische Methoden

Die statistischen Analysen der Daten des Vitalitätsversuches, der FACS-Daten und des Zytokinassays erfolgte mittels der GraphPad Prism Software (Version 8.2.1, von GraphPad Software, Kalifornien, USA). Die Vitalitätsmessungen erfolgten in drei unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplikaten. Die Apoptose-Messung mittels FACS erfolgte ebenfalls in drei unabhängigen Experimenten. Die Daten des Vitalitätsversuchs und der FACS-Analyse wurden aus der Versuchssoftware in Excel-Tabellen zusammengefasst und in die GraphPad Prism Software übertragen. Für die Western Blots wurden je drei unabhängige Experimente pro Zelllinie zur Herstellung von Gesamtzelllysaten durchgeführt. Hieraus erfolgte die Durchführung von je drei WB pro Zelllinie.

### 3.12.1 Auswertung des Vitalitätsversuchs

Die Darstellung der Vitalitätsanalysen erfolgt in Histogrammen zum direkten Vergleich von mit KA und Propandiol behandelten Zellen, sowie unbehandelten Zellen. Die Vitalität der Zellen wurde vorab wie folgt berechnet: Die Vitalität der unbehandelten Zellen wurde aus den Mittelwerten der unbehandelten Zellen in Kulturmedium bestimmt, von denen das Lumineszenzsignal des reinen Kulturmediums subtrahiert wurde. Die Vitalität der mit KA und der mit Propandiol behandelten Zellen wurde nach demselben Schema berechnet, wobei die Lumineszenz des Kulturmediums versetzt mit KA-Extrakt, bzw. mit Propandiol subtrahiert wurde. Die Vitalitätsraten werden in den Histogrammen als Mittelwerte mit Standardabweichung und Signifikanzniveau dargestellt. Die Signifikanzniveaus wurden mithilfe von Oneway ANOVAs (Analysis of Variance) ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 gesetzt (ns = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.12.2 Western-Blot-Auswertung

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen WB-Experimenten pro Zelllinie. Quantifizierung des Proteingehaltes erfolgte mittels Bildanalyse durch die ImageJ Software (Version 1.53t, von Wayne Rasband and National Institutes of Health, USA). Nach der quantitativen Messung der Signale wurden Mittelwerte sowie Standardabweichungen ermittelt.

### 3.12.3 Durchflusszytometrie-Auswertung

Die Ergebnisse der Apoptose-Analysen mittels FACS werden ebenfalls in Histogrammen mit Standardabweichung und Signifikanzniveau dargestellt. Die FACS-Messdaten wurden in Excel-Tabellen zusammengefasst und in die GraphPad Prism Software übertragen. Die Signifikanzniveaus wurden mittels Oneway ANOVAs aus drei unabhängigen Messungen ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 gesetzt (ns = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Phytochemische Analyse des KA-Extraktes

Der für die Behandlung genutzte KA-Extrakt wurde auf bestimmte Inhaltsstoffe mit zuvor beschriebenen antiinflammatorischen und antitumoralen Eigenschaften untersucht. Die entsprechende Datenanalyse wurde freundlicherweise von Ahrens et al. (2022) zur Verfügung gestellt. Wie in Abbildung 10 dargestellt, enthält das Fruchtextrakt verschiedene Phenole, von denen Verbascosid mit 9,3 mg/L am höchsten konzentriert war. Weitere Inhaltsstoffe aus den Substanzklassen der Flavonoide (Luteolin, Cynarosid) und Iridoide (Catalposid, Minescosid) konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Nicht nachweisbar im genutzten Extrakt waren Lapachol, 6-Hydroxyluteolin und Atranorin.

Chemical class	Compound	Concentration in mg/L
Phenolic Compounds	Verbascoside	9.3
	Ferulic acid	4.3
	Coumaric acid	1.9
Depside	Atranorin	0
Flavonoids	Luteolin	0.22
	6-Hydroxyluteolin	0
	Cynaroside (Luteolin-7-O-glucoside)	0.27
Iridoids	Catalposide	0.042
	Minescoside	0.6
Quinone	Lapachol	0

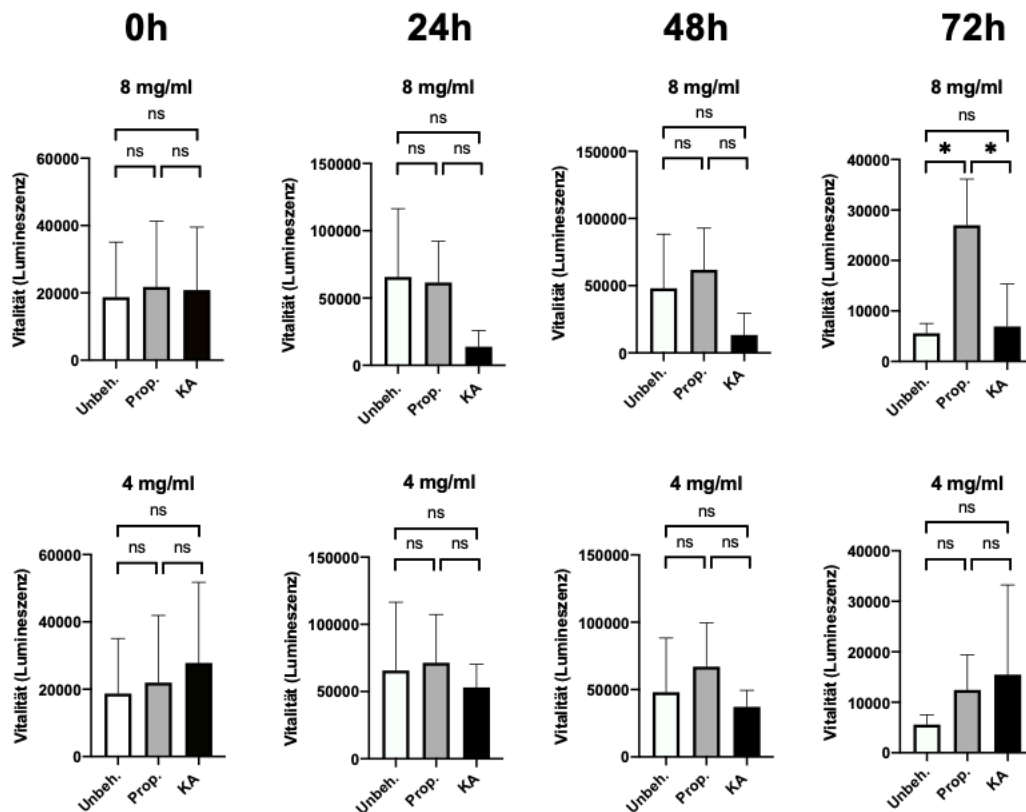
**Abb.10: Analyse der phytochemischen Komponenten des KA-Fruchtextraktes mittels Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie.** (“Composition (mg/L) of phytochemicals in *Kigelia africana* fruit extract.” (Ahrens et al., 2022))

### 4.2 Einfluss der *Kigelia africana* auf die Zellvitalität

Um die Vitalität der Zellen zu bestimmen, erfolgte die Durchführung des Luciferase-basierten Lumineszenz-Assays. Der Assay erfolgte mit allen drei Zelllinien, sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen des KA-Extraktes und der Propandiol-Lösung. Die Messung der Vitalität wurde unmittelbar nach Behandlung (0 h) sowie 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung durchgeführt.

#### 4.2.1 CCD-1064-SK-Zelllinie

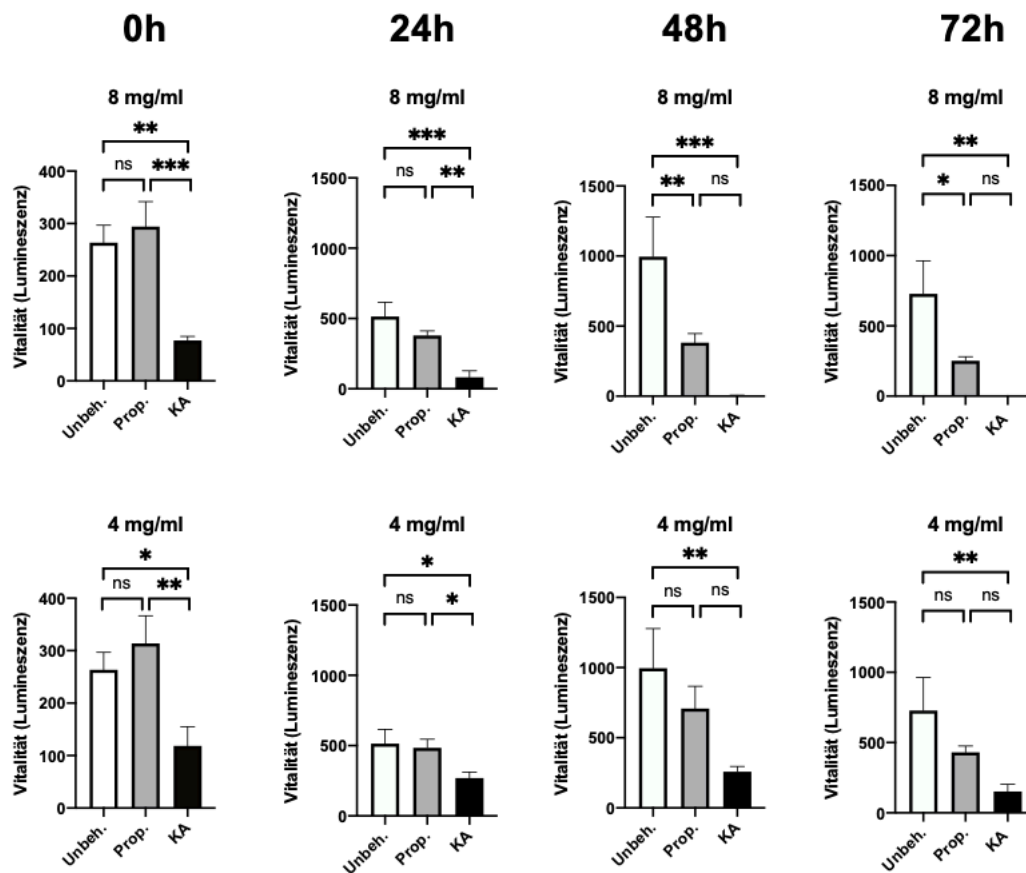
Wie in Abb. 11 gezeigt, ergab die Vitalitätsanalyse der nichtneoplastischen Fibroblasten bei den Behandlungen mit 1 mg/ml, 2 mg/ml und 4 mg/ml KA, bzw. Propandiol keine signifikanten Unterschiede (1 mg/ml und 2 mg/ml Daten hier nicht gezeigt). Die Behandlung mit KA oder Propandiol schien keine unmittelbare Wirkung auf die Vitalität der Zellen zum 0 h Zeitpunkt zu haben. Zudem zeigten sich weder zwischen den Messzeitpunkten nach 24 h, 48 h und 72 h, noch im Vergleich mit den unbehandelten Zellen signifikant veränderte Vitalitätsraten der Zellen nach der KA-Behandlung verglichen mit der Propandiol-Behandlung. Lediglich nach Behandlung mit der höchsten Konzentration (8 mg/ml) zeigten sich die mit Propandiol behandelten Zellen nach 72 h vitaler als die Kontrollgruppe und die mit KA behandelten Zellen.



**Abb. 11: Zeit- und dosisabhängige Vitalität der CCD-1064-SK-Zelllinie nach Behandlung.** Die Behandlung erfolgte mit Zellkulturmedium (Unbeh.), 65% Propandiol (Prop.) oder 8 mg/ml bzw. 4 mg/ml Kigelia africana Extrakt (KA). Die Stärke der Lumineszenz ist proportional zu der Menge an lebendigen Zellen. Darstellung der Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung. Analyse mittels One-way ANOVA (ns = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ). (2mg/ml und 1mg/ml Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.2 LS-Zelllinie

Die N-myc amplifizierten LS-Zellen zeigten bei allen KA-Konzentrationen signifikante Vitalitätsunterschiede zwischen der Behandlung mit KA und Propandiol, wie in Abb. 12 sichtbar. Bei den niedrigeren Konzentrationen (1 mg/ml und 2 mg/ml, Daten hier nicht gezeigt) zeigten sich diese Unterschiede vor allem zum 72 h Zeitpunkt, mit signifikantem Unterschied zwischen unbehandelten und mit KA behandelten Zellen. Die Behandlung mit höheren Konzentrationen (4 mg/ml und 8 mg/ml) zeigte signifikante Vitalitätsunterschiede zu allen Messzeitpunkten, mit steigendem Signifikanzniveau bei steigender Konzentration. Dies weist auf einen sowohl dosis- als auch zeitabhängigen Effekt des KA-Extraktes auf die Vitalität und Proliferation der Tumorzellen hin.

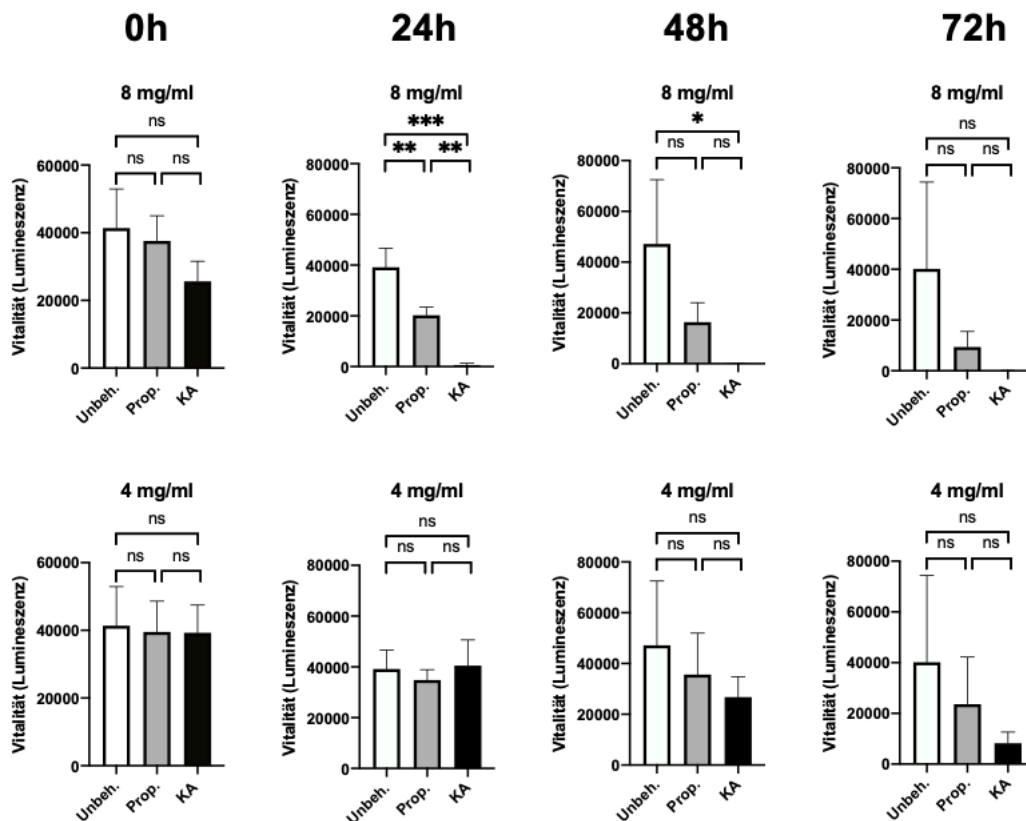


**Abb. 12: Zeit- und dosisabhängige Vitalität der LS-Zelllinie nach Behandlung.** Die Behandlung erfolgte mit Zellkulturmedium (Unbeh.), 65% Propandiol (Prop.) oder 8 mg/ml bzw. 4 mg/ml *Kigelia africana* Extrakt (KA). Die Stärke der Lumineszenz ist proportional zu der Menge an lebendigen Zellen. Darstellung der Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung. Analyse mittels One-way ANOVA (ns = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ). (2mg/ml und 1mg/ml Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.3 NB69-Zelllinie

Die Vitalitätsanalyse dieser nicht N-myc amplifizierten Neuroblastomzellen zeigte ebenfalls eine Reduktion der Zellvitalität nach Behandlung mit KA. Wie in Abb. 13 sichtbar wird, zeigte sich die Vitalitätsreduktion insbesondere bei der höchsten KA-Konzentration, wo sich statistisch signifikante Unterschiede zur Behandlung mit Propandiol bzw. zur Kontrollgruppe ergaben. Trotz ausbleibender statistischer Signifikanz nahm die Vitalität der Zellen auch nach Behandlung mit 4 mg/ml KA deutlich ab. Die Vitalitätsreduktion zeigte sich bei den geringeren Konzentrationen erst zu den späteren Messzeitpunkten (1 mg/ml und 2 mg/ml, Daten hier nicht gezeigt). Auch hier lässt sich eine Zeit- und dosisabhängige Wirkung vermuten.





**Abb. 13: Zeit- und dosisabhängige Vitalität der NB69-Zelllinie nach Behandlung.** Die Behandlung erfolgte mit Zellkulturmedium (Unbeh.), 65% Propandiol (Prop.) oder 8 mg/ml bzw. 4 mg/ml Kigelia africana Extrakt (KA). Die Stärke der Lumineszenz ist proportional zu der Menge an lebendigen Zellen. Darstellung der Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung. Analyse mittels One-way ANOVA (ns = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ). (2mg/ml und 1mg/ml Daten nicht gezeigt).

### 4.3 FACS-Analyse nach *Kigelia africana* Exposition

#### 4.3.1 GD2-Expriemierung

Zunächst erfolgte die Analyse der drei Zelllinien auf GD2-positiven Zellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit 4 mg/ml KA, Propandiol oder Medium. Die zuvor durchgeführten Vitalitätsanalysen zeigten bei einer KA-Konzentration von 8 mg/ml einen starken Einfluss auf die Vitalität der Tumorzellen (vgl. Abb. 12 & 13). Daher wurden die durchflusszytometrischen Versuche mit einer Konzentration von 4 mg/ml KA durchgeführt, um genügend lebendige Zellen zu erhalten, um den Effekt der KA messen zu können.

Es ließ sich zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied in der GD2-Expriemierung der drei Zelllinien feststellen. Sie lag zu allen Zeitpunkten und unabhängig von der erfolgten Behandlung bei nahezu 100 Prozent und schien somit nicht durch die

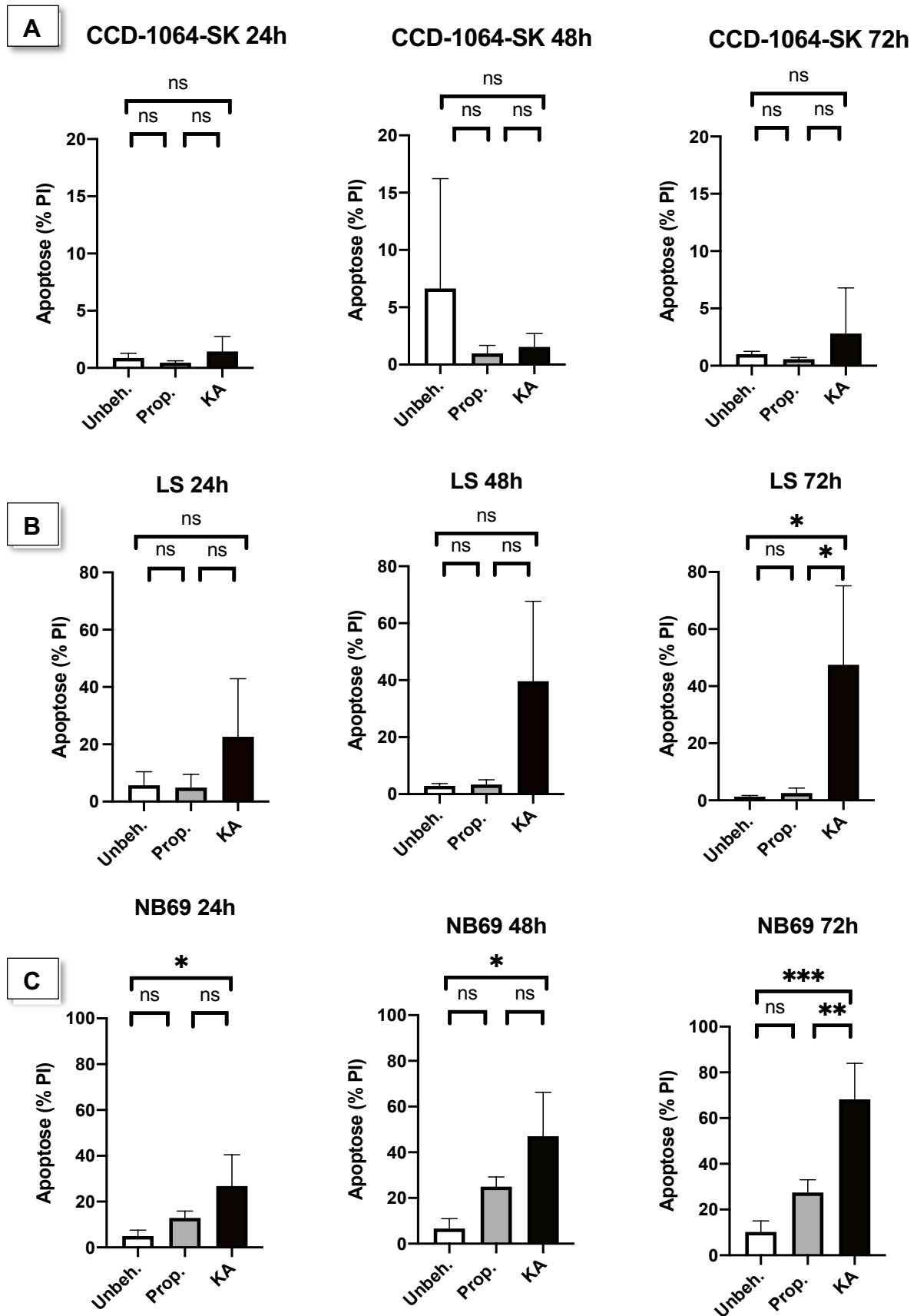
KA-Behandlung beeinflusst zu werden. In der PI-Apoptose-Auswertung erfolgte somit die Auswertung der GD2-positiven Zellen, als Unterscheidungsmerkmal von vorhandenem Zell-Debris.

### 4.3.2 Apoptosemessung

Die Apoptosemessung erfolgte für alle der Zelllinien mit der Propidiumjodid-Färbung. In der durchflusszytometrischen Analyse der nichtneoplastischen Fibroblasten ließ sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate zwischen den unbehandelten und den mit 4 mg/ml KA oder dementsprechendem Propandiol behandelten Zellen nachweisen, wie in Abb. 14 A abgebildet.

Während die unbehandelten LS-Zellen und die LS-Zellen nach Behandlung mit Propandiol nahezu keinen Anstieg in der Apoptoserate zeigten, stieg diese nach KA-Behandlung deutlich an. Es zeigte sich nach 72 h ein statistisch signifikanter Unterschied sowohl zwischen unbehandelten und KA-behandelten Zellen als auch zwischen Propandiol- und KA-behandelten Zellen (vgl. Abb. 14 B).

Wie in Abb. 14 C abgebildet wies auch die zweite tumorale Zelllinie eine deutlich erhöhte Apoptoserate nach KA-Exposition auf. Die NB69-Zellen zeigten zu allen Zeitpunkten deutliche Unterschiede zwischen den unbehandelten Zellen und den Zellen nach KA-Behandlung. Nach 72 h zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied zwischen der KA- und der Propandiol-Behandlung.



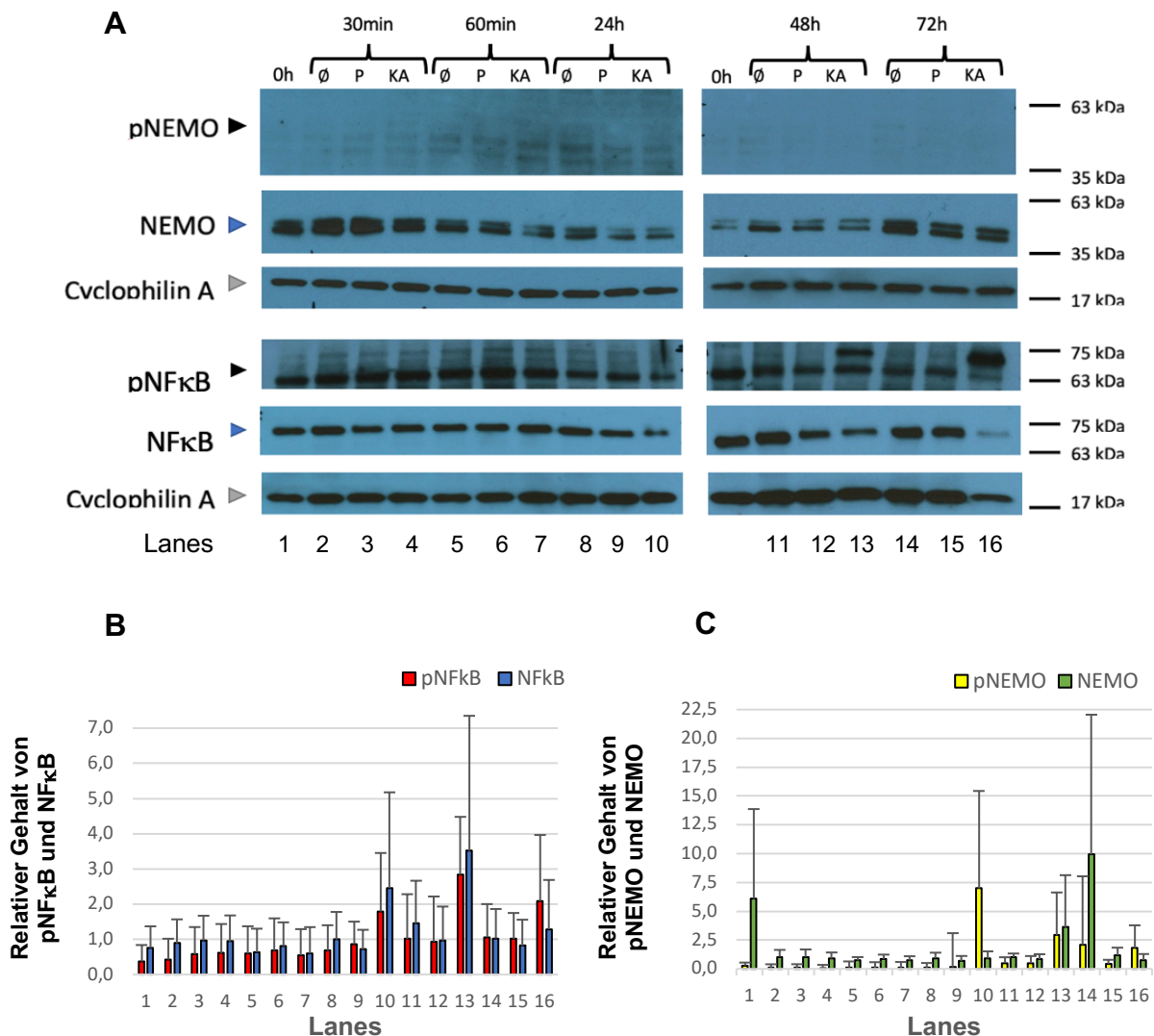
**Abb. 14 A-C: Darstellung der Apoptoserate der drei Zelllinien nach 24 h, 48 h und 72 h.** Die Behandlung erfolgte mit Zellkulturmedium (Unbeh.), 65% Propandiol (Prop.) oder 4 mg/ml *Kigelia africana* Extrakt (KA). Darstellung der Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung. Analyse mittels One-way ANOVA (ns = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 4.4 Western Blot: NF $\kappa$ B-Induktion in Neuroblastomzellen durch *Kigelia africana* Behandlung

Um die vermutete Induktion des NF $\kappa$ B-Signalweges durch die KA-Behandlung beurteilen zu können, erfolgte der Nachweis einzelner Komponenten der Signaltransduktion des NF $\kappa$ B-Signalweges mittels Western Blot Analysen. Die drei genutzten Zelllinien wurden in Bezug auf die Expression und den Phosphorylierungsstatus von NF $\kappa$ B (p65) und NEMO zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach KA-Behandlung untersucht (Abb. 15-17). Um Aufschluss über die molekularen Details des induzierten NF $\kappa$ B-Aktivierungswegs zu erlangen, erfolgte der Nachweis von spezifischen Phosphorylierungen an Serin-Resten. Für NEMO wurde im Rahmen der Aktivierung die Phosphorylierung von Ser376 analysiert, für NF $\kappa$ B die Phosphorylierung von Ser536. Für die Western Blot Analysen wurden wie zuvor beschrieben Gesamtzelllysate der Zeitpunkte 30 min, 60 min, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung genutzt. Als Kontrolle der KA-behandelten Zellen dienten jeweils Gesamtzelllysate von mit Propandiol (Prop65%) behandelten und unbehandelten Zellen. Als normierende Ladekontrolle diente Cyclophilin A.

#### 4.4.1 CCD-1064-SK-Zelllinie

Bei den Fibroblasten ließ sich nach KA-Behandlung kein Nachweis für ein an Ser376 phosphoryliertes NEMO erbringen, wie in Abb. 15 A abgebildet. Die Expression von nicht phosphoryliertem NEMO in Fibroblasten schien bis auf wenige unspezifische Signale über alle Messzeitpunkte hinweg recht konstant zu bleiben, ohne deutliche Regulation durch die unterschiedlichen Behandlungen zu zeigen. Zu den späteren Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h) nach KA-Behandlung zeigte sich eine verstärkte Expression von NF $\kappa$ B, sowie von phosphoryliertem NF $\kappa$ B im Vergleich zu unbehandelten und mit Propandiol behandelten Zellen (vgl. Abb. 15 A und B)

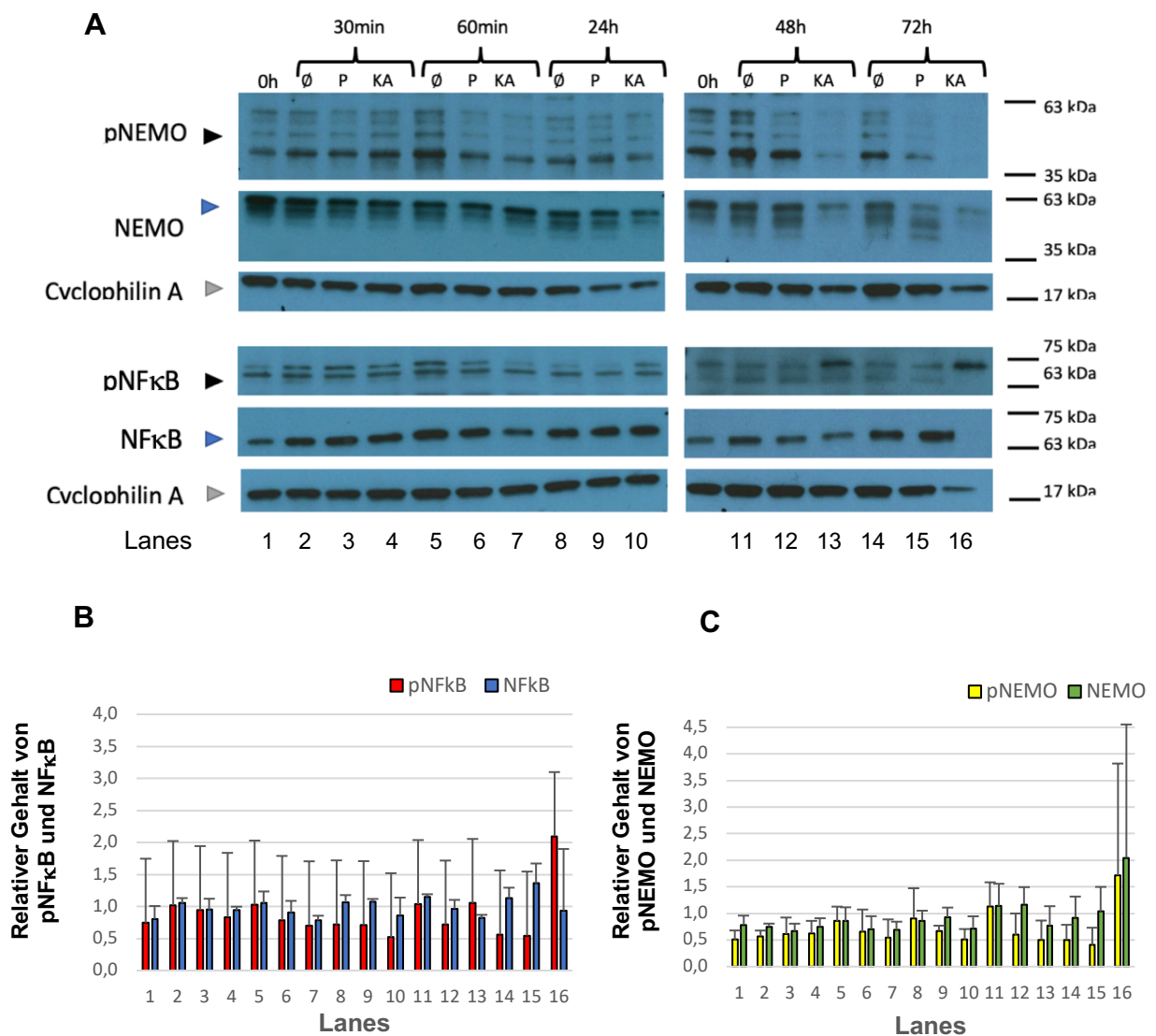


**Abb. 15 A-C: Proteinexpression der CCD-1064-SK-Zelllinie.** Darstellung der Effekte des KA-Extraktes (KA) mit einer Konzentration von 7,5 mg/ml auf die Expression und den Phosphorylierungsstatus von NF $\kappa$ B und NEMO im Vergleich mit der Propandiollösung (P) und unbehandelten Zellen ( $\emptyset$ ). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen WB-Experimenten pro Zelllinie (Abb. A). Grafisch dargestellt ist die Semiquantifizierung der Western Blot Ergebnisse. Abgebildet sind die Mittelwerte des Gehalts an Zielprotein (p)NF $\kappa$ B (Abb. B) und (p)NEMO (Abb. C) relativ zum Cyclophilin-Gehalt aus drei biologischen Replikaten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

#### 4.4.2 LS-Zelllinie

In den LS-Zellen bewirkte die Behandlung mit KA im Vergleich zu unbehandelten und mit Propandiol behandelten Zellen eine deutliche Erhöhung des phosphorylierten NF $\kappa$ B nach 48 h und insbesondere 72 h, wodurch von einer erhöhten Aktivierung ausgegangen werden kann (vgl. Abb. 16 A und B). Die Expression von NF $\kappa$ B erfolgte zu allen Zeitpunkten recht gleichmäßig, unabhängig von der erfolgten Behandlung. Auch in dieser Zelllinie ergab die

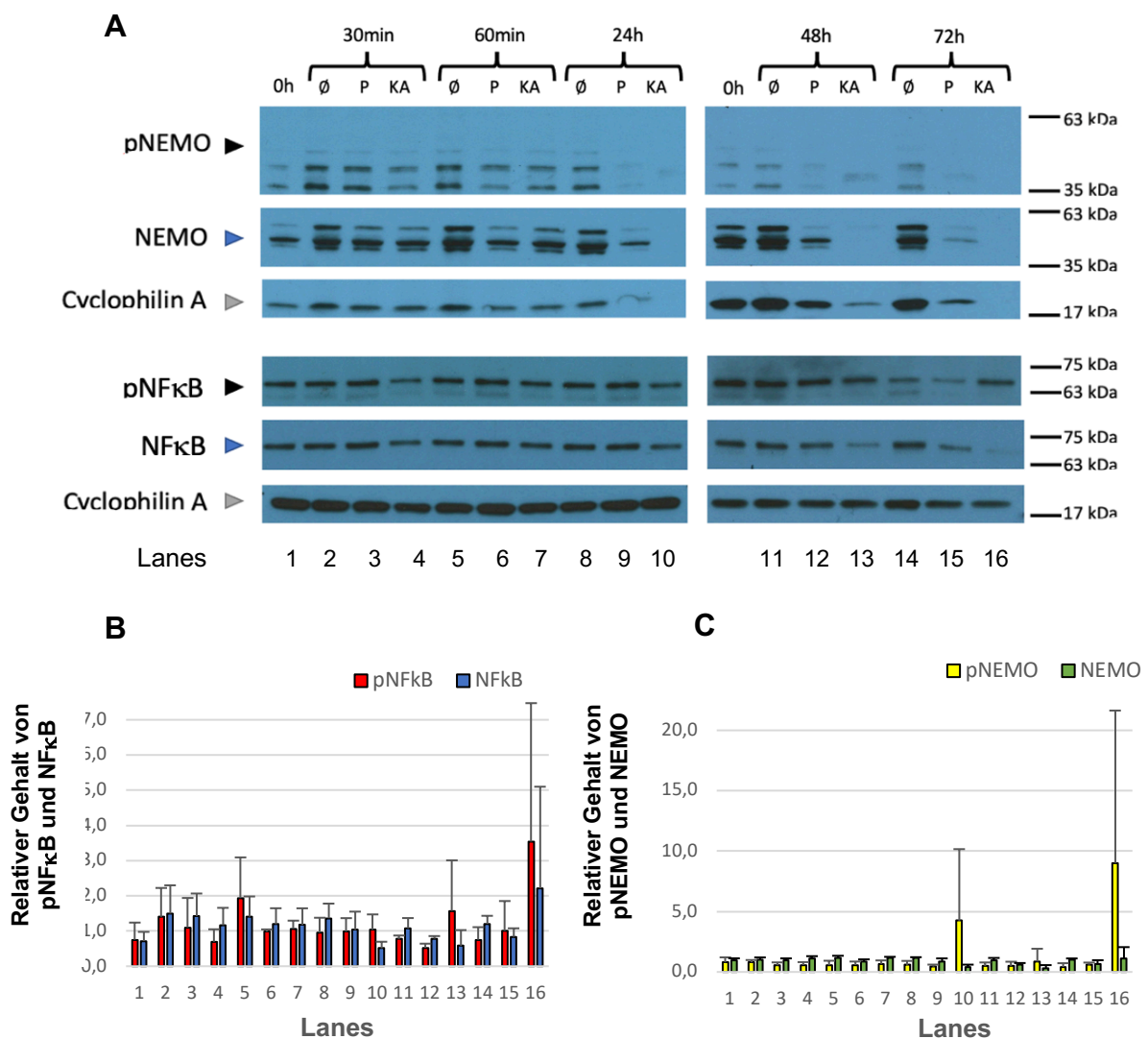
Western Blot Analyse kein spezifisches Signal für phosphoryliertes NEMO (vgl. Abb. 16 A). Die Expression von NEMO stellte sich über die Messzeitpunkte hinweg recht konstant dar und zeigte lediglich 48 h und 72 h nach KA-Behandlung einige Schwankungen. Die Gesamtproteinmenge der Lysate war zu diesen Zeitpunkten durch die hohe Zahl apoptotischer Zellen nach der KA-Exposition verringert, was sich in dem geringeren Cyclophilin A Gehalt widerspiegelt (Vgl. Abb. 16 A und C).



**Abb. 16 A-C: Proteinexpression der LS-Zelllinie.** Darstellung der Effekte des KA-Extraktes (KA) mit einer Konzentration von 7,5 mg/ml auf die Expression und den Phosphorylierungsstatus von NFκB und NEMO im Vergleich mit der Propandiollösung (P) und unbehandelten Zellen (Ø). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen WB-Experimenten pro Zelllinie (Abb. A). Grafisch dargestellt ist die Semiquantifizierung der Western Blot Ergebnisse. Abgebildet sind die Mittelwerte des Gehalts an Zielprotein (p)NFκB (Abb. B) und (p)NEMO (Abb. C) relativ zum Cyclophilin-Gehalt aus drei biologischen Replikaten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

#### 4.4.3 NB69-Zelllinie

Auch die NB69-Zellen zeigten nach der KA-Behandlung nur schwache, unspezifische Signale für pNEMO, sodass von keiner gezielten Phosphorylierung und Aktivierung ausgegangen werden kann (vgl. Abb. 17 A und C). Die Abnahme des pNEMO und NEMO-Signals im WB zum 48 h und 72 h Zeitpunkt nach KA-Behandlung kann hier auf den deutlich reduzierten Proteingehalt der Lysate zurückgeführt werden. Das abgeschwächte Signal von Cyclophilin A spiegelt auch hier die reduzierte Gesamtproteinmenge durch die reduzierte Anzahl vitaler Zellen nach Behandlung mit KA wider. Die NB69-Zellen zeigten eine Zunahme der NF $\kappa$ B-Phosphorylierung 72 h nach KA-Behandlung, während auch die gesamte NF $\kappa$ B-Expression nach 72 h etwas verstärkt zu sein schien (vgl. Abb. 17 B).



**Abb. 17 A-C: Proteinexpression der NB69-Zelllinie.** Darstellung der Effekte des KA-Extraktes (KA) mit einer Konzentration von 7,5 mg/ml auf die Expression und den

Phosphorylierungsstatus von NF $\kappa$ B und NEMO im Vergleich mit der Propandiollösung (P) und unbehandelten Zellen ( $\emptyset$ ). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen WB-Experimenten pro Zelllinie (Abb. A). Grafisch dargestellt ist die Semiquantifizierung der Western Blot Ergebnisse. Abgebildet sind die Mittelwerte des Gehalts an Zielprotein (p)NF $\kappa$ B (Abb. B) und (p)NEMO (Abb. C) relativ zum Cyclophilin-Gehalt aus drei biologischen Replikaten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Zusammenfassend konnten mithilfe der Immunoblots in allen drei Zelllinien Nachweise einer Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges durch die Steigerung der Phosphorylierung an Ser536 des p65-Moleküls erbracht werden (vgl. Abb. 15-17). Die KA-Behandlung führte bei allen drei Zelllinien zu einer Signalverstärkung von phosphoryliertem NF $\kappa$ B primär nach 48 h (CCD-1064-SK und LS) und 72 h (alle drei Zelllinien). Während die Behandlung der Fibroblasten keinerlei Nachweise für NEMO-Phosphorylierung erbrachte, ließen sich bei beiden Tumorzelllinien lediglich unspezifische Signale nach Inkubation mit dem pNEMO-Antikörper darstellen. Die teilweise veränderte Signalintensität der Western Blots insbesondere der mit KA-Extrakt behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten oder mit Propandiol behandelten Zellen ist auf den zytotoxischen Effekt des Extraktes zurückzuführen, welcher sich in der erniedrigten Gesamtproteinmenge der Lysate widerspiegelt. Der zytotoxische Effekt wurde ebenso in den Ergebnissen der Vitalitätsanalysen und durchflusszytometrischen Apoptosemessungen belegt.

### 4.5 Immunfluoreszenz

Die Mikroskopie der Immunfluoreszenz-gefärbten Zellen diente der quantitativen Beurteilung des Gehaltes von EGFR, GD2, NF $\kappa$ B und pNF $\kappa$ B in den unbehandelten Zellen und den Zellen 24 h nach Behandlung mit 1 mg/ml KA oder Propandiol. Um möglichst sensitiv Veränderungen ohne starke Apoptoseinduktion in den Zellen darzustellen, erfolgte die Behandlung mit einer Konzentration von 1 mg/ml KA. Zusätzlich zu den spezifischen Immunfluoreszenz-Färbungen lassen die Bilder Rückschlüsse auf die Zellmorphologie der Zellen nach Behandlung ziehen. Insbesondere die zwei Tumorzelllinien zeigten nach KA-Behandlung deutliche Anzeichen der Zellschädigung, wie eine veränderte Zellgröße und -form und einen pyknotisch veränderten Nukleus (vgl. Abb. 18 B-C und 19 B-C). Wie in Abb. 18 A und 19 A



sichtbar, stellten sich die Fibroblasten nach KA-Behandlung weniger formverändert dar. Alle drei Zelllinien zeigen im direkten Vergleich 24 h nach Propandiol-Exposition deutlich weniger Anzeichen der Zellschädigung als nach KA-Exposition.

### 4.5.1 Neuroblastomzellen zeigen KA-induzierte EGFR-Translokation

Die Mikroskopie der Immunfluoreszenz-gefärbten CCD-1064-SK-Zellen zeigte eine verminderte zytoplasmatische Expression des EGFR nach KA-Exposition im Vergleich zu den mit Propandiol behandelten und unbehandelten Zellen (vgl. Abb. 18 A). Die beiden Tumorzelllinien hingegen zeigten eine leicht reduzierte zytoplasmatische Expression des Rezeptors 24 h nach Propandiol-Behandlung im Vergleich mit den unbehandelten Zellen. Beide Tumorzelllinien zeigten nach KA-Behandlung eine Translokation des EGFR-Signals in den Nukleus, verglichen mit den mit Propandiol behandelten Zellen. Insbesondere die NB69-Zellen ließen zudem im Vergleich mit den mit Propandiol behandelten Zellen eine verstärkte EGFR-Expression nach KA-Behandlung vermuten (vgl. Abb. 18 B und C). Die quantitative Beurteilung der EGFR-Expression nach KA-Behandlung wurde durch die veränderte Zellmorphologie der Tumorzellen erschwert.

### 4.5.2 GD2-Expression variiert nach KA-Behandlung

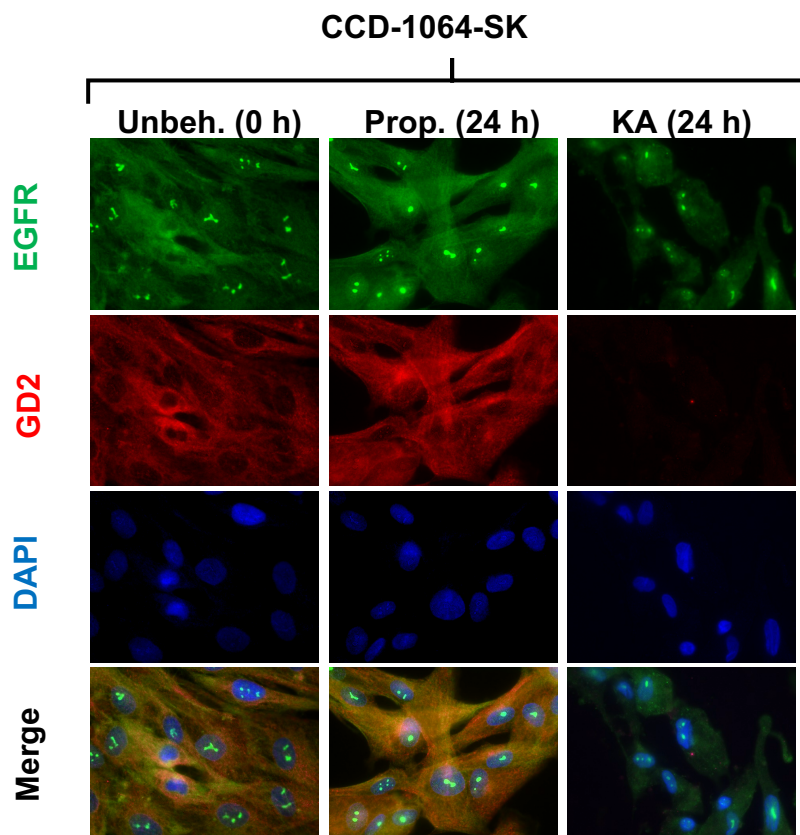
Die CCD-1064-SK-Zellen zeigten eine deutliche Abnahme der GD2-Expression 24 h nach KA-Exposition im Vergleich zu den unbehandelten und mit Propandiol behandelten Zellen (vgl. Abb. 18 A). Auch die NB69-Zellen exprimierten 24 h nach Propandiol-Behandlung weniger GD2, nach KA-Behandlung jedoch mehr GD2, während die LS-Zellen 24 h nach beiden Behandlungen vermehrt GD2 exprimierten (vgl. Abb. 18 B und C).

### 4.5.3 Neuroblastomzellen zeigen NF $\kappa$ B-Aktivierung nach KA- und Propandiol-Behandlung

Für die CCD-1064-SK-Zellen ließ sich unabhängig von der Behandlung nach 24 h kein pNF $\kappa$ B-Signal nachweisen (vgl. Abb. 19 A). Im Gegensatz hierzu zeigten beide Tumorzelllinien bei konstantem NF $\kappa$ B-Signal eine vermehrte NF $\kappa$ B-Aktivierung 24 h nach Propandiol- und KA-Behandlung im Vergleich mit den unbehandelten Zellen (vgl. Abb. 19 B-C). Dementsprechend zeigte sich die phosphorylierte Form von NF $\kappa$ B leicht vermehrt im Zytoplasma und umso stärker

im Nukleus der Zellen. Zwischen der Behandlung mit Propandiol und KA ließ sich hier kein eindeutiger Unterschied in der NFκB-Aktivierung nachweisen.

**Abb. 18 A-C: Immunfluoreszenz-Bilder der EGFR- und GD2-Expression CCD-1064-SK-, LS- und NB69-Zelllinie.** Darstellung der Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern für EGFR (grün), GD2 (rot), und DAPI (blau, Kernfärbung) sowie Merge-Bilder. Bilder der unbehandelten Zellen (0h), sowie Zellen 24 h nach Behandlung mit 1 mg/ml KA oder Prop.



**Abb. 18 A: IF-Bilder der CCD-1064-SK-Zelllinie**

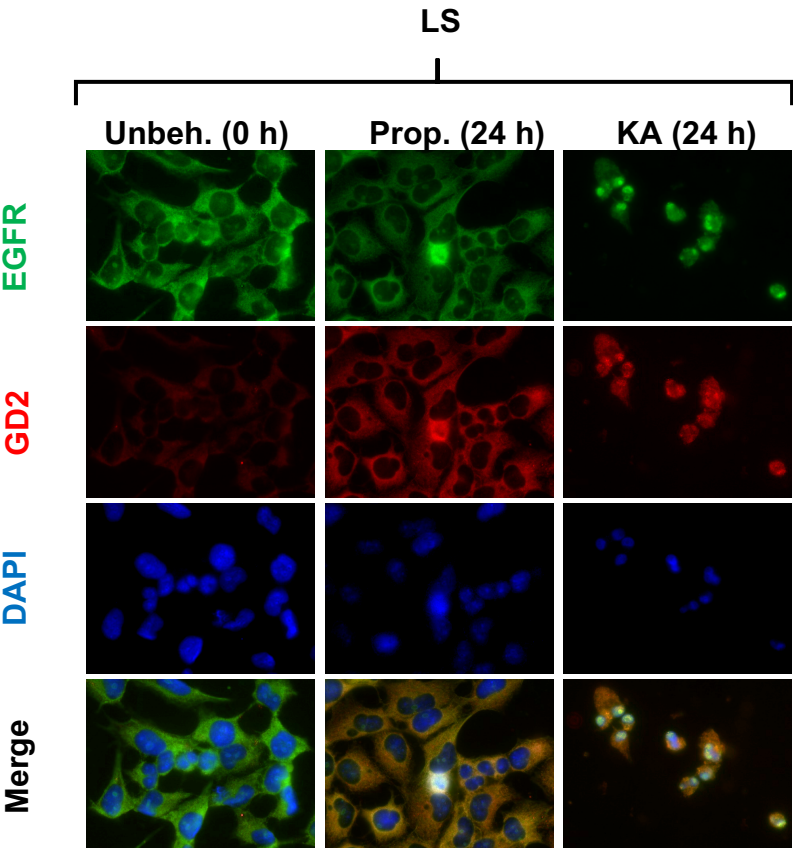


Abb. 18 B: IF-Bilder der LS-Zelllinie

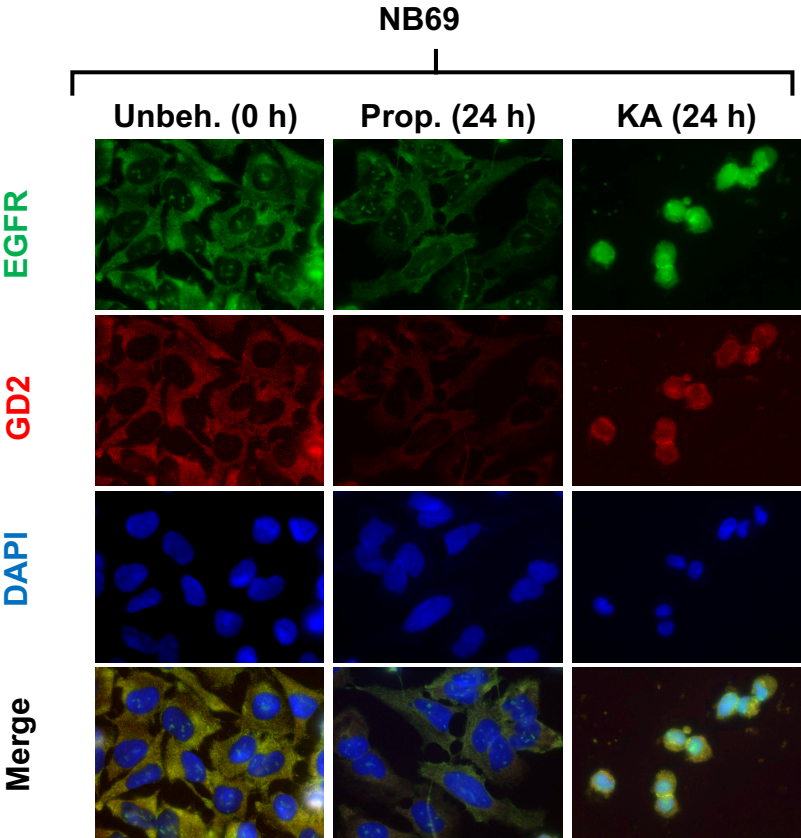
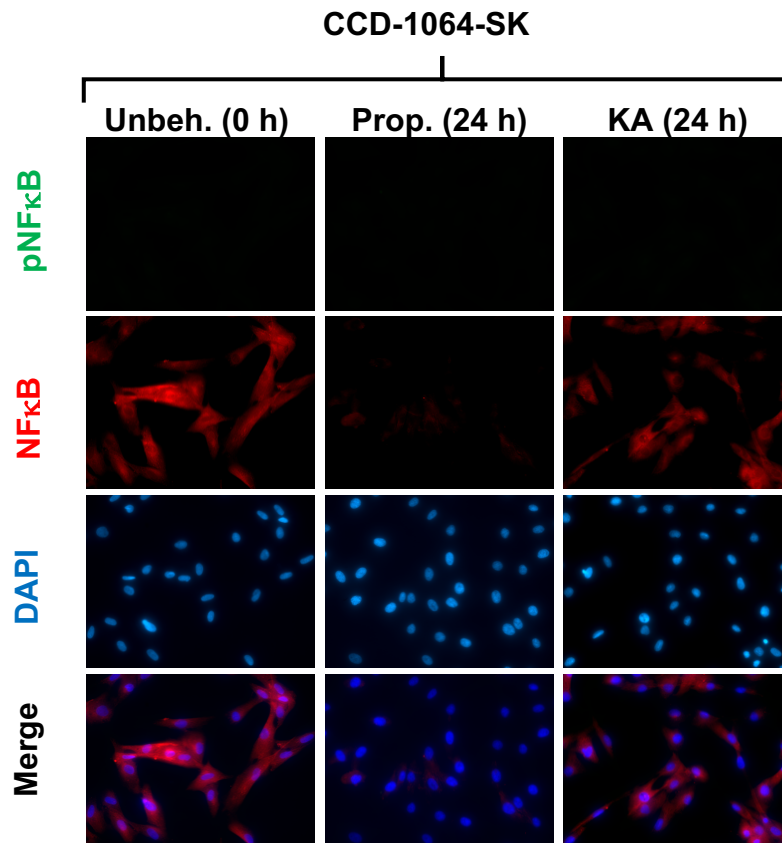


Abb. 18 C: IF-Bilder der NB69-Zelllinie

**Abb. 19 A-C: Immunfluoreszenz-Bilder der pNF $\kappa$ B- und NF $\kappa$ B-Expression der CCD-1064-SK-, LS- und NB69-Zelllinie.** Darstellung der Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern für pNF $\kappa$ B (grün), NF $\kappa$ B (rot) und DAPI (blau, Kernfärbung) sowie Merge-Bilder. Bilder der unbehandelten Zellen (0h), sowie Zellen 24 h nach Behandlung mit 1 mg/ml KA oder Prop.



**Abb. 19 A: IF-Bilder der CCD-1064-SK-Zelllinie**

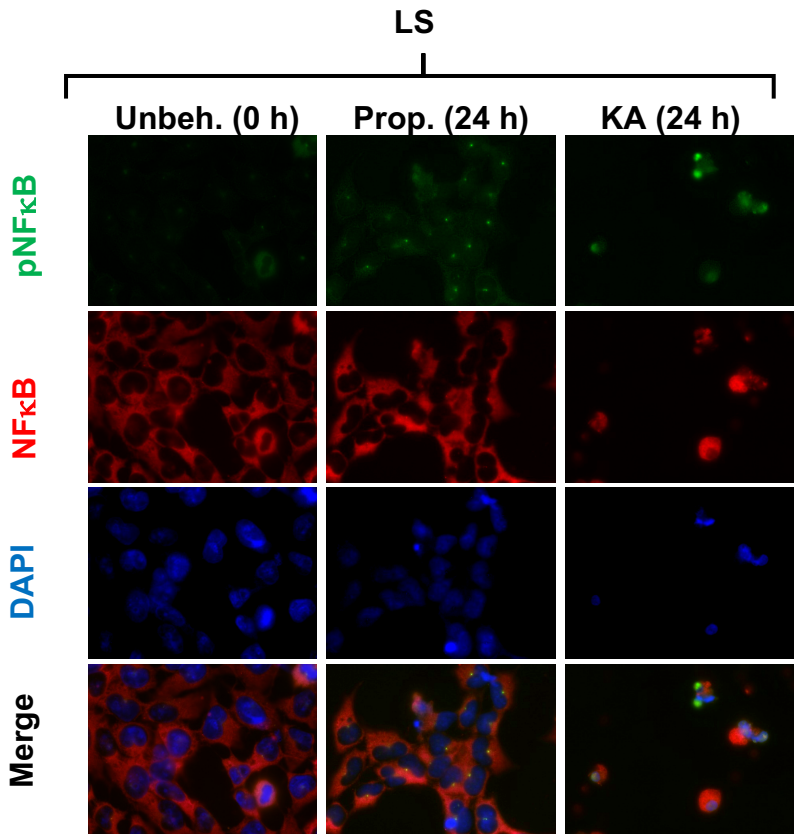


Abb. 19 B: IF-Bilder der LS-Zelllinie

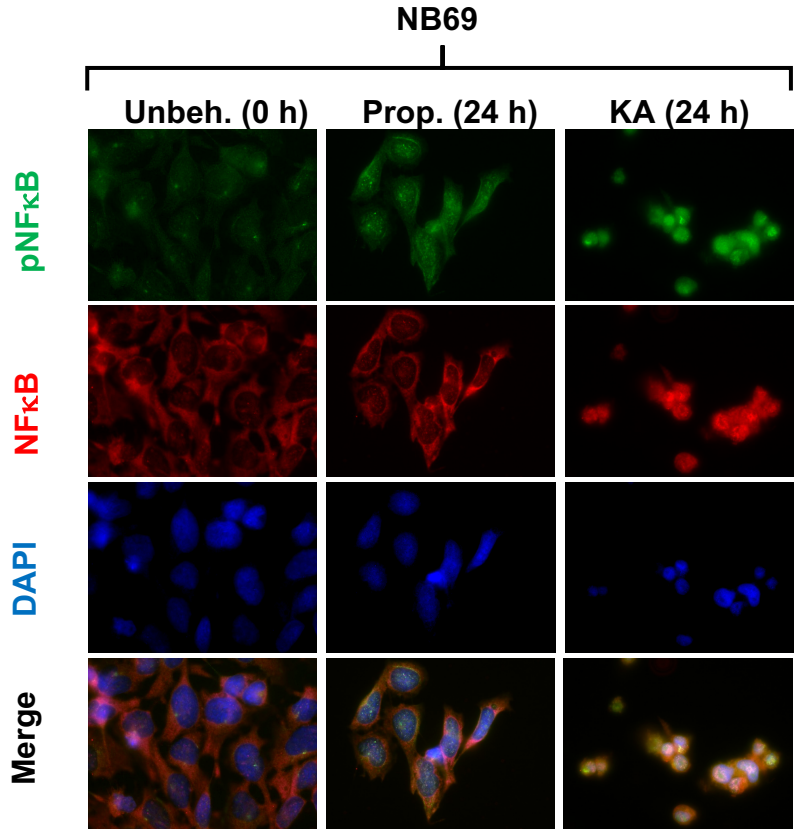


Abb. 19 C: IF-Bilder der NB69-Zelllini

## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die antineoplastische Wirksamkeit der *Kigelia africana* auf Neuroblastomzellen *in vitro* zu untersuchen. Bisherige Erkenntnisse zeigen eine antineoplastische Wirkung der *Kigelia africana* auf verschiedene Krebszelllinien, jedoch ohne genauere Informationen zum Wirkmechanismus der Pflanze (Singh et al., 2018, Higgins et al., 2010, Jackson et al., 2000, Yani et al., 2018, Houghton et al., 1994). Um zukünftig potenziellen therapeutischen Nutzen aus den Eigenschaften der *Kigelia africana* ziehen zu können, sollte diese Arbeit neue Informationen zu ihren Wirkmechanismen liefern. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Versuche durchgeführt, die das Zellüberleben und die Proliferationshemmung nach KA-Exposition untersuchten. Zusätzlich sollte die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges, dessen Rolle im Zusammenhang mit dem Überleben von Neuroblastomzellen bisher weitestgehend unklar blieb, als möglicher intrazellulärer Wirkmechanismus nachgewiesen werden. Um die Einflüsse der KA-Behandlung auf die intra- und extrazelluläre Kommunikation zu untersuchen, wurde die Expression Neuroblastom-typischer molekularer Marker wie GD2 und EGFR gemessen.

Nach Einschätzung der World Health Organization (WHO) stieg in den letzten Jahren die Nutzung von traditioneller und pflanzlicher Medizin global an. In Ländern des globalen Südens ist sie aufgrund niedriger Kosten und leichter Zugänglichkeit Teil der medizinischen Grundversorgung, doch auch in Ländern des globalen Nordens mit konventionellem Gesundheitssystem wird die traditionelle Medizin komplementär zu diesem genutzt (World Health Organization, 2013). Um die 60% der antineoplastischen und antiinfektiösen Medikamente auf dem Markt stammen ursprünglich von pflanzlichen Produkten ab (Arena et al., 2020). Schon lange sind aus Pflanzen gewonnene oder chemisch abgeleitete Stoffe in der Therapie verschiedener Krebserkrankungen etabliert. Beispiele für pflanzliche Zytostatika mit heutigem klinischen Nutzen sind Taxane wie Paclitaxel, ursprünglich aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert und Vinca-Alkaloide wie Vincristin mit dem Ursprung aus Madagaskar-Immergrün (*Catharanthus roseus/ Vinca rosea*) (Medinger et al., 2003). Auch

einzelne Phytochemikalien (sekundäre Pflanzenstoffe) zeigen zunehmend ihr Potential in der Krebsforschung (Khatoon et al., 2022). Grundsätzlich sind Medikamente pflanzlichen Ursprungs und ihre Derivate auch in der westlichen Medizin nicht mehr wegzudenken.

In dieser Arbeit sollte zunächst ein potenzieller Effekt des KA-Extraktes auf die damit behandelten Zellen *in vitro* überprüft werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die *Kigelia africana* einen unterschiedlichen Effekt auf die tumoralen und nichttumoralen Zellen ausübte. Die Vitalitätsanalysen wiesen eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der Zellvitalität bei beiden Tumorzelllinien nach, während die Vitalität der nichtneoplastischen Zellen nicht maßgeblich beeinflusst wurde. Diese Veränderungen in der Vitalität können entweder auf ein modifiziertes Proliferationsverhalten und/oder eine veränderte Apoptoserate zurückgeführt werden. Die abfallende Vitalität der unbehandelten LS-Zellen zum 72-Stunden-Zeitpunkt ist am ehesten durch das schnelle Wachstum dieser Zelllinie und daraus resultierendem Mangel an Platz und Substraten im Vergleich zu den langsamer Wachsenden NB69- und CCD-1064-SK-Zellen zu erklären.

Die Apoptose-induzierende Wirkung von *Kigelia africana* auf Tumorzellen konnte bereits bei unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen werden, wie u.a. Higgins et al. (2010) in Melanomzelllinien und Guon und Chung (2016) in Kolonkarzinomzellen zeigten. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate in beiden Tumorzelllinien nach Behandlung mit dem Fruchtextrakt. Die nicht-neoplastischen Fibroblasten zeigten zu keinem Zeitpunkt nach der Behandlung eine signifikant gesteigerte Apoptoserate. Der geringere zytotoxische Effekt der KA auf nicht-neoplastische Zelllinien konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden (Chivandi et al., 2012, Ahrens et al., 2022). Der zytotoxische Effekt konnte durch den Vergleich zwischen KA-Extrakt und Propandiol-Lösung direkt auf die Phytokomponenten des KA-Extraktes zurückgeführt werden. Visualisiert wurde dieser Effekt durch die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Sie zeigte eine deutliche Veränderung der Tumorzellmorphologie nach Behandlung mit dem KA-Extrakt, während die CCD-1064-SK-Zellen wenig morphologische Veränderungen aufwiesen.

In der Klinik ist die Amplifikation des MYCN-Gens mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf, Therapieversagen und schlechterem Überleben assoziiert (Ruiz-Pérez et al., 2017). Während die MYCN-amplifizierten LS-Zellen erst nach 72 h einen signifikanten Apoptoseanstieg zeigten, zeigte sich diese Tendenz und statistische Signifikanz bei den nicht MYCN-amplifizierten NB69-Zellen bereits nach 24 h und stieg dann weiter an. Insgesamt schienen die NB69-Zellen grundsätzlich etwas sensibler auf die Behandlungen anzusprechen. Eine ähnliche Beobachtung machten Ahrens et al. (2022), bei deren Arbeit sich Neuroblastomzellen ohne MYCN-Amplifikation sensibler für die Behandlung mit KA zeigten als MYCN-amplifizierte Tumorzellen. Mithilfe der Vitalitätstests ließen sich durch das zelluläre Reduktionspotential Rückschlüsse auf die Anzahl metabolisch aktiver Zellen zum Zeitpunkt der Messung schließen. Mittels Propidiumjodid-Färbung untersuchten wir in der Durchflusszytometrie, welche Zellen sich in späten Stadien der Apoptose mit bereits permeabler Zellmembran befanden. Die NB69-Zellen zeigten im Zellvitalitätsversuch erst bei der höchsten KA-Konzentration einen signifikant eingeschränkten Zellmetabolismus, hatten jedoch insgesamt eine höhere Apoptoserate als die LS-Zellen. Obwohl die LS-Zellen auch bei geringeren KA-Konzentrationen einen eingeschränkten Zellmetabolismus zeigten, konnten diese Zellen teilweise der Apoptose entgehen, was sich durchflusszytometrisch in einer etwas niedrigeren Gesamtapoptoserate zeigte. Dies stimmt mit dem aggressiveren Krankheitsverlauf und schlechteren Therapieansprechen von MYCN-amplifizierten Tumorzellen in der Klinik überein. Da MYCN sowohl Zellproliferation als auch Apoptose aktivieren kann und zudem in Prozesse der Zellzykluskontrolle und Metastasierung eingebunden ist, kann der Metabolismus der Zelllinien hierdurch unterschiedlich reguliert werden (Huang and Weiss, 2013). Unterstützend zu unseren Ergebnissen beschrieben Houghton et al. (1994) bereits eine unterschiedliche Sensibilität verschiedener Krebszelllinien auf die Behandlung mit *Kigelia africana* und ließen variables Ansprechen je nach Tumorentität und verschiedenen molekularen Markern vermuten.

NF $\kappa$ B fungiert als Teil eines komplexen Netzwerkes aus intrazellulären Kommunikationskaskaden, die einander in Aktivierungsstatus und angestrebten Zielgenen beeinflussen (Hoesel and Schmid, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte mithilfe der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen und Western



Blots die Expression von NF $\kappa$ B und die durch *Kigelia africana* ausgelöste Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges über die Phosphorylierung am p65-Molekül und Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden. Diese ließ sich in allen drei Zelllinien darstellen und gilt als wichtiger Faktor in der Transkriptionsaktivierung (Sakurai et al., 2003). Proliferation und Überleben der Tumorzellen wurden durch die KA-Behandlung deutlich stärker beeinflusst als die der nichttumoralen Zellen. Lange wurde davon ausgegangen, dass NF $\kappa$ B lediglich antiapoptotische Effekte durch die Expression antiapoptotischer Proteine und Blockade von Signalkaskaden bewirke (Dolcet et al., 2005). Die Aktivierung von NF $\kappa$ B kann jedoch auch die Tumorsuppression fördern

(Tilborghs et al., 2017): Obwohl die NF $\kappa$ B-Aktivierung in den meisten Zellen die Stimulation antiapoptotischer Gene bewirkt, konnte nachgewiesen werden, dass die Apoptose unter bestimmten Umständen auch NF $\kappa$ B-abhängig stimuliert wird (Dutta et al., 2006, Dolcet et al., 2005). Zellen können durch NF $\kappa$ B-induzierte Genexpression für proapoptotische Stimuli sensibilisiert werden oder über NF $\kappa$ B direkt die Transkription proapoptotischer Proteine induzieren. Zu den proapoptotischen Zielgenen der NF $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren gehören Zelltodrezeptoren wie Fas (CD95) sowie proapoptotische Liganden wie Fas-Ligand, TNF $\alpha$  und Bax (Dutta et al., 2006). Proapoptotische Stimuli führen zur NF $\kappa$ B-abhängigen Induktion des programmierten Zelltods. Dies geschieht u.a. über die Veränderung der transkriptionalen Zielgene und der Promoter-Spezifität, sowie über posttranslationale Modifikationen von NF $\kappa$ B, bzw. der p65-Untereinheit selbst. Die Phosphorylierung von p65 an verschiedenen Aminosäureresten konnte als wichtiger Regulator der NF $\kappa$ B-induzierten Gene identifiziert werden und kann über die Apoptose induzierende oder protektive Wirkung von NF $\kappa$ B entscheiden. Welcher dieser beiden Wirkmechanismen durch NF $\kappa$ B-vermittelte Transkription in Gang gesetzt wird, scheint hierbei vom Zelltyp, der Art des zugrundeliegenden Stimulus und dem zellulären Mikroumfeld abzuhängen. (Dutta et al., 2006)

Die Aktivierung der NF $\kappa$ B-Signalkaskade durch einige alternative Krebstherapien mit nachfolgender proapoptotischer Wirkung auf Tumorzellen konnte bereits zuvor beobachtet werden (Bassères and Baldwin, 2006). Ahrens et al (2022) hingegen beobachteten eine höhere Apoptoseresistenz bei Neuroblastomzellen

des Stadiums 4 mit vermehrter NF $\kappa$ B-Aktivierung und vermuteten daraufhin eine protektive Rolle von NF $\kappa$ B gegen die zytotoxische Wirkung der KA. Die in dieser Arbeit behandelten Neuroblastomzellen des Stadiums 3 zeigten beide vergleichbare Level an NF $\kappa$ B-Aktivierung. Die nichttumoralen CCD-1064-SK Zellen zeigten in den WB-Analysen nach 48 h und 72 h ebenfalls eine NF $\kappa$ B-Aktivierung und schienen der zytotoxischen Wirkung der KA gegenüber resistenter als die Tumorzellen zu sein. Die NF $\kappa$ B-Aktivierung scheint somit nicht an sich der Indikator für eine durch KA induzierte Apoptose oder Apoptoseresistenz zu sein, sondern lediglich die zelluläre Reaktion auf die KA-Behandlung. Im Kontext der Literatur weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf unterschiedliche nachgeschaltete Effektoren der NF $\kappa$ B-Signalkaskade nach KA-Stimulus und auf die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden in tumoralen und nichttumoralen Zellen hin.

Die Expression und Phosphorylierung von NEMO an Ser376 als wichtiger Bestandteil des kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweges nach KA-Behandlung konnte für keine der drei Zelllinien nachgewiesen werden. Während die nichtneoplastischen CCD-1064-SK Zellen keine Expression eines phosphorylierten IKK $\gamma$  (NEMO) zeigten, ließen sich bei den beiden Tumorzelllinien unspezifische Signale für pNEMO darstellen, die nicht mit der Molekülgröße von 50kDa übereinstimmten. Carter et al. (2003) beschrieben die NEMO-Phosphorylierung an unterschiedlichen Serin-Resten, sodass die Aktivierung verwandter Isoformen von NEMO mit alternativen Modifikationen nicht ausgeschlossen bleibt.

Um mögliche Veränderungen in der Expression von Zelloberflächenmolekülen zu detektieren, wurden FACS-Analysen der GD2-Expression durchgeführt. Die Detektion von GD2 und EGFR mittels Immunfluoreszenzfärbungen sollte zusätzlich die potenzielle Wirkung des KA-Extraktes auf die Zellkommunikation visualisieren. Dies ließ sich mithilfe spezifischer Antikörperbindungen und dem Nachweis von Translokation der Zielmoleküle in den Zellkern zeigen.

GD2 ist als wichtiger Spieler in der Zellkommunikation bei Neuroblastomzellen bekannt (Nazha et al., 2020). Die Messung der Expression nach KA-Exposition ergab folgende Ergebnisse: Alle drei Zelllinien zeigten in der durchflusszytometrischen Analyse unverändert hohe GD2-Exprimierung zu allen

Messzeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h, 72 h), unabhängig von der erfolgten Behandlung. Diese Ergebnisse stützen die Beobachtung der Stadien- und Behandlungsunabhängigen GD2-Expression auf Neuroblastomzellen anderer Studien (Sait and Modak, 2017). Eine GD2-Expression von Fibroblasten ist bisher nicht bekannt, wurde in dieser Arbeit jedoch mittels verschiedener Antikörper in unabhängigen FACS- und Immunfluoreszenz-Versuchen nachgewiesen. Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie zeigte leicht variierende GD2-Exprimierung aller Zelllinien 24 Stunden nach Behandlung mit 1 mg/ml KA. Die zur Apoptosemessung eingesetzte Durchflusszytometrie erfolgte jedoch unter Verwendung einer deutlich höheren KA-Konzentration von 4 mg/ml, was als möglicher Einflussfaktor berücksichtigt werden sollte. GD2 bezeichnet zudem eine Subspezies von Disialogangliosiden, die sich durch strukturelle und molekulare Modifikationen unterscheiden (Machy et al., 2023). Die Bindung spezifischer Subformen von GD2 durch die unterschiedlichen genutzten Antikörper ist somit ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für diese Ergebnisse. Eine Beeinflussung der Zellkommunikation mithilfe von GD2 nach KA-Exposition konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Während die IF-Ergebnisse andeuten, dass CCD-1064-SK-Zellen GD2 etwas herunterregulierten, schienen die Tumorzelllinien eine leichte Tendenz zur vermehrten GD2-Exprimierung zu zeigen. Verschiedene Studien zeigten in den letzten Jahren die Möglichkeit einer induzierten Erhöhung der GD2-Exprimierung in Neuroblastomzellen, welche bis zu diesem Zeitpunkt jedoch noch ohne klinische Relevanz bleibt (Machy et al., 2023).

EGFR ist als Wachstumsfaktorrezeptor in vielen Fällen an der Entstehung und Proliferation von Tumorzellen beteiligt (Sabbah et al., 2020). In vielen etablierten Therapieregimen ist die Therapie mit EGFR-Inhibitoren daher heute längst nicht mehr wegzudenken (Yan and Efferth, 2019). Auch Neuroblastomzellen weisen vermehrt EGFR-Überexpression auf, die klinisch oft mit einem malignen Progress einhergeht (Zheng et al., 2016, Högnason et al., 2001). Die Förderung des Tumorzellwachstums durch das Zusammenspiel und Überexpression der EGFR- und NF $\kappa$ B-Signalwege konnte bereits in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Alberti et al., 2012, Lehman et al., 2018). Die durchgeführte Immunfluoreszenz zeigte in den CCD-1064-SK Zellen eine verminderte Expression des Wachstumsfaktorrezeptors nach Behandlung mit

*Kigelia africana*. Die Tumorzelllinien entgegen zeigten nach KA-Behandlung eine Translokation des Signals in den Zellkern, wobei insbesondere bei den NB69 die Signalintensität verstärkt wurde. Nach Translokation in den Zellkern beeinflusst der EGFR die Transkription der Zelle (Brand et al., 2013). Ähnliche Beobachtungen machten Ahrens et al. (2022), bei denen Zellen ohne MYCN-Amplifikation mit erhöhter EGFR-Expression auf KA-Behandlung reagierten. Eine vermehrte EGFR-Expression kann in Tumorzellen die ligandenvermittelte Apoptose einleiten, was sich in den erhöhten Apoptoseraten der NB69-Zellen dieser Arbeit widerspiegelt (Högnason et al., 2001). Auch in anderen Neuroblastomzelllinien konnte eine erhöhte EGFR-Expression als Reaktion auf zytotoxische Stimuli beobachtet werden (Michaelis et al., 2008). Diese Arbeit zeigt somit die Möglichkeit der KA-assoziierten Regulierung der EGFR-Expression in Neuroblastomzellen. Um diese Beobachtung zu überprüfen sind weitere Untersuchungen, möglichst mit weiteren Neuroblastomzelllinien unter KA-Behandlung notwendig.

Grundsätzlich zeigt eine erhöhte EGFR-Expression in Tumorzellen eine Korrelation zu Medikamentenresistenzentwicklung (Yan and Efferth, 2019). Insbesondere die zytotoxische Wirkung natürlicher Produkte scheint jedoch weniger durch Resistenzentwicklung beeinträchtigt zu werden (Yan and Efferth, 2019). Dies zeigt im Hinblick auf die Korrelation zwischen Chemotherapieresistenz und EGFR-Überexpression in Neuroblastomzellen Potential für zukünftige Therapieansätze (Michaelis et al., 2008).

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Anwendungsgebiete in der traditionellen Medizin und der nachgewiesenen antineoplastischen Wirkung, ist die biochemische Zusammensetzung der *Kigelia africana* von großem Interesse. Die vorhandene Studienlage unterscheidet sich hier hinsichtlich der genutzten Pflanzenbestandteile, Probengewinnung, Extraktions- und Analysemethoden. Es konnten 150 verschiedene Inhaltsstoffe der Pflanze identifiziert werden, deren größte Gruppen Iridoide, Naphtoquinone, Flavonoide, Terpene und Phenylethanolglykoside darstellen (Bello et al., 2016). Die chemische Analyse sollte helfen die antineoplastische Aktivität des genutzten KA-Extraktes auf bestimmte Phytokomponenten zurückführen zu können, die bereits antiinflammatorische und antitumorale Wirkung auf verschiedene Krebszelllinien

gezeigt hatten: Verbascosid konnte auch in anderen KA-Fruchtexttrakten als eine der am höchsten konzentrierten bioaktiven Komponenten identifiziert werden und zeigt proliferations- und metastasierungshemmende Wirkung auf Brust- und Ovarialkarzinomzellen (Costa et al., 2017, Daneshforouz et al., 2021, Ren et al., 2022). Ein potenzieller Nutzen zeigte sich zudem in der Chemosensibilisierung von Kolonkarzinomzellen (Attia et al., 2018). Die ebenfalls nachgewiesene Ferulasäure (ferulic acid) bewirkt die Induktion eines Zellzyklusarrests und Apoptose, sowie die Inhibition von Zellinvasion und Migration (Bao et al., 2023). Cumarsäure wirkt in Kolonkarzinomzellen proliferationshemmend, ebenso Luteolin in Glioblastomzellen (Anson et al., 2018, Roy et al., 2016). In Brustkrebs- und Kolonkarzinomzellen inhibiert Minescosid die Metastasierung durch Suppression des Chemokinrezeptors CXCR4 (Kim et al., 2020). Die Analyse weist bereits viele bioaktive Inhaltsstoffe im hier genutzten Fruchtextrakt nach, die in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Vitalitäts- und Apoptosemessungen das therapeutische Potential der *Kigelia africana* verdeutlichen.

Trotz der Therapiefortschritte der letzten Jahre erleiden viele Neuroblastompatienten mit hohem Risikoprofil ein Rezidiv oder zeigen nur unzureichendes Ansprechen auf die initiale Therapie (Whittle et al., 2017). Für diese Patienten gibt es keine gut etablierten, kurativen Therapieschemata und die Gesamtüberlebensrate von Patienten nach einem Neuroblastomrezidiv liegt bei 20% (Whittle et al., 2017). Die Entwicklung von Resistenzmechanismen wie der Immunevasion trägt zum geringen Therapieerfolg in dieser Patientengruppe bei (Kholodenko et al., 2018). Rezidivtumoren zeigen durch vorangegangene Chemotherapie häufig eine deutlich veränderte Biologie im Vergleich zum Primärtumor (Whittle et al., 2017).

Phytochemikalien zeigen zunehmend ihr Potenzial als Chemosensibilisierer von Tumorzellen *in vitro*, *in vivo* und in klinischen Versuchen (Khatoon et al., 2022). Die Chemosensibilisierung von Krebszellen und Unterdrückung von Medikamentenresistenzen durch einzelne, in der KA enthaltene Komponenten gelang bereits in verschiedenen *in vitro* Versuchen (Costea et al., 2020, Lin et al., 2008). Eine Steigerung der Therapieeffektivität auf Neuroblastom-Zellen konnte in der Immuntherapie durch die Kombination von IL-2 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) mit einem Anti-GD2-AK

nachgewiesen werden (Pistoia et al., 2011). Durch die Kombination scheint die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität auf die Tumorzellen verstärkt zu werden (Pistoia et al., 2011). Diese Erkenntnisse verdeutlichen die Relevanz alternativer Therapieoptionen zur Steigerung der Therapieeffektivität und möglicher Chemosensibilisierung von NB-Zellen. Die Bandbreite der beteiligten molekularen Mechanismen spiegelt die Heterogenität der Neuroblastomerkrankung wider und verdeutlicht die Herausforderungen in deren Forschung und Behandlung.

## 6 Zusammenfassung

Als eine der am häufigsten im Kindesalter auftretenden Tumorentitäten ist das Neuroblastom in der Klinik und der Krebsforschung ein hochrelevantes Thema. Die Konstellation verschiedener Risikofaktoren und eine hohe Rezidivrate bereiten weiterhin große Hindernisse in der Neuroblastomtherapie und machen die Forschung zu zusätzlichen Therapieoptionen unerlässlich. Die *Kigelia africana* gilt als traditionelle Heilpflanze und bietet großes Potential im Rahmen der Krebsforschung. Diese wissenschaftliche Arbeit demonstriert das antineoplastische Potential der *Kigelia africana* und bietet Einblicke in deren molekulare Wirkmechanismen in Neuroblastomzellen *in vitro*. Sie liefert Nachweise für die dosis- und zeitabhängige, signifikante Hemmung zweier Neuroblastomzelllinien. Diese Hemmung zeigt sich bei positivem Status des klinischen Hochrisikomerkmals der MYCN-Gen-Amplifikation in einer der Zelllinien und geht mit einem gleichzeitig geringeren zytotoxischen Effekt auf die nichtneoplastische Zelllinie einher. Zusätzlich weisen die hier gewonnenen Erkenntnisse die Beteiligung der NF $\kappa$ B-Signalkaskade und deren Aktivierung über das p65-Molekül als Wirkmechanismus nach. Es zeigte sich keine Modulation der Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit NEMO am Ser376-Molekül nach KA-Behandlung. Die Beeinflussung des Zellmetabolismus und der zellulären Kommunikation von Neuroblastomzellen durch Regulierung von EGFR und NF $\kappa$ B durch die *Kigelia africana* wird mittels Immunfluoreszenz und Western Blot nachgewiesen. Während diese und weitere Arbeiten die antineoplastische Wirkung der *Kigelia africana* nachweisen, fehlen weiterhin genaue Details über die biologisch aktiven Inhaltsstoffe der Pflanze und deren molekulare Wirkmechanismen. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit würden sie zum besseren Verständnis der antineoplastischen Wirkung beitragen, um die *Kigelia africana* als zukünftigen Bestandteil der Krebsforschung nutzen zu können. Diese Dissertation liefert Nachweise für das therapeutische Potenzial der *Kigelia africana* im Hinblick auf direkte Apoptoseinduktion von Tumorzellen. Zusätzlich bietet sie Hinweise für den potenziellen Nutzen der *Kigelia africana* im Rahmen der Tumorzellsensibilisierung zur Erweiterung bereits bestehender Therapieregime.

## 6.1 Summary

Neuroblastoma is one of the most frequent occurring cancers in children and remains a challenge in research and therapy. Combinations of different risk factors and a high relapse rate among neuroblastoma patients underline the importance of additional treatment options. *Kigelia africana* is a traditional healing plant and possesses great potential as an anticancer agent as shown in the present and many other studies.

This experimental study demonstrates antineoplastic properties of *Kigelia africana* (KA) against neuroblastoma cells in vitro. It presents clear evidence for the significant inhibition of two neuroblastoma cell lines in a dose and time dependent manner, of which one shows the clinical high risk factor of MYCN-gene-amplification. At the same time the plant extract showed little cytotoxicity towards the tested non-neoplastic cell line. This dissertation additionally yields proof for KA-mediated activation of the NF $\kappa$ B-Pathway via phosphorylation of the p65-subunit as a central mechanism of action. Activation of the NF $\kappa$ B-Pathway may occur via the non-canonical pathway or through different posttranslational modified versions of the NEMO subunit. Nevertheless, *Kigelia africana* treated cells showed mediation of cell metabolism and cell communication through affecting EGFR and NF $\kappa$ B expression and activation. As proven in this and many other studies *Kigelia africana* yields promising anticancer effects in various tumor entities, while very little is known about its bioactive phytocomponents and mechanisms of action. Based on results of this dissertation further knowledge in this regard would be of great benefit in order to utilize *Kigelia africana* in future cancer research.

In summary, this dissertation demonstrates the therapeutic potential of *Kigelia africana* by direct induction of apoptosis in neuroblastoma cells in vitro. Furthermore, it provides insights about its effect mechanism and potential role in chemosensitization of neuroblastoma cells and augmentation of established therapeutic options. The range of underlying molecular mechanisms reflects the heterogeneity of neuroblastoma disease and highlights the challenges in its research and treatment.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALK	Anaplastischen Lymphomkinase
ANOVA	Analysis of Variance
ATCC	American Type Culture Collection
BAFF	B-Zell Aktivierungsfaktor
BSA	Bovine Serum Albumin
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
ECL	Enhanced chemiluminescence
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GD2	Disialogangliosid 2
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
I $\kappa$ B	Inhibitor of nuclear factor kappa B
IDRF	Image Defined Risk Factors
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL-1	Interleukin-1
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
INGRSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
JAK/STAT	Januskinase/ signal transducers and activators of transcription
KA	<i>Kigelia africana</i>
MIBG	Metaiodobenzylguanidin
MRT	Magnetresonanztomographie
MYCN	N-Myc
NB	Neuroblastom
NEMO	NF $\kappa$ B essential modulator
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NIK	NF $\kappa$ B-inducing-kinase
NLS	Nuclear localisation sequence
NSE	Neuronenspezifische Enolase
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PHOX2B	Paired-like homeobox 2B-Gen
PI	Propidiumjodid
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Akt
RAS/MAPK	RAS/Map-Kinase
RHR	Rel-homology-region
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TA	Transaktivierungsdomäne

TBS.....	Tris-Buffered Saline
TBST .....	Tris-Buffered Saline -Tween
TGF- $\alpha$ .....	Transforming growth factor
WB .....	Western Blots
WHO .....	World Health Organization

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Neuralrohrs und der Neuralleiste...	7
Abbildung 2: Übersicht der Klassifikationssysteme des Neuroblastoms.....	12
Abbildung 3: Einteilung der Neuroblastompatienten in drei Risikogruppen.....	13
Abbildung 4: Die fünf Mitglieder der NF $\kappa$ B/Rel-Familie.....	17
Abbildung 5: Schematische Abbildung der NF $\kappa$ B-Signalwege.....	18
Abbildung 6: Schematische Abbildung der EGFR-Aktivierung.....	21
Abbildung 7: Schematische Versuchsdarstellung der Vitalitätsmessung.....	31
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte für den Nachweis der Proteinexpression mittels Western-Blot.....	33
Abbildung 9: Schematische Versuchsdarstellung der Gesamtzelllysat- Herstellung.....	34
Abbildung 10: Analyse der phytochemischen Komponenten des KA- Fruchtextraktes mittels Flüssigchromatographie mit Tandem- Massenspektrometrie.....	41
Abbildung 11: Zeit- und dosisabhängige Vitalität der CCD-1064-SK-Zelllinie nach Behandlung.....	43
Abbildung 12: Zeit- und dosisabhängige Vitalität der LS-Zelllinie nach Behandlung.....	44
Abbildung 13: Zeit- und dosisabhängige Vitalität der NB69-Zelllinie nach Behandlung.....	45
Abbildung 14 A-C: Apoptoserate der drei Zelllinien nach 24 h, 48 h und 72 h..	47
Abbildung 15 A-C: Proteinexpression der CCD-1064-SK-Zelllinie.....	49
Abbildung 16 A-C: Proteinexpression der LS-Zelllinie.....	50
Abbildung 17 A-C: Proteinexpression der NB69-Zelllinie.....	51
Abbildung 18 A-C: Immunfluoreszenz-Bilder der EGFR- und GD2-Expression der CCD-1064-SK-, LS- und NB69-Zelllinie.....	54-55
Abbildung 19 A-C: Immunfluoreszenz-Bilder der pNF $\kappa$ B- und NF $\kappa$ B-Expression der CCD-1064-SK-, LS- und NB69-Zelllinie.....	56-57

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genutzte Laborgeräte .....	25
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	26
Tabelle 3: Auswertungsprogramme .....	26
Tabelle 4: Inhaltsstoffe und Hersteller der genutzten Puffer und Lösungen .....	27
Tabelle 5: Informationen zu den verwendeten Zelllinien.....	29
Tabelle 6: Primär- und Sekundärantikörper für Western Blots .....	37
Tabelle 7: Antikörper für die Immunfluoreszenz .....	39

## 10 Literaturverzeichnis

- AHRENS, S., APPL, B., TROCHIMIUK, M., DÜCKER, C., FEIXAS SERRA, G., OLIVER GRAU, A., REINSHAGEN, K. & PAGEROLS RALUY, L. 2022. Kigelia africana inhibits proliferation and induces cell death in stage 4 Neuroblastoma cell lines. *Biomed Pharmacother*, 154, 113584.
- ALBERTI, C., PINCIROLI, P., VALERI, B., FERRI, R., DITTO, A., UMEZAWA, K., SENSI, M., CANEVARI, S. & TOMASSETTI, A. 2012. Ligand-dependent EGFR activation induces the co-expression of IL-6 and PAI-1 via the NFkB pathway in advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Oncogene*, 31, 4139-49.
- ANSON, D. M., WILCOX, R. M., HUSEMAN, E. D., STUMP, T. A., PARIS, R. L., DARKWAH, B. O., LIN, S., ADEGOKE, A. O., GRYKA, R. J., JEAN-LOUIS, D. S. & AMOS, S. 2018. Luteolin Decreases Epidermal Growth Factor Receptor-Mediated Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Glioblastoma Cell Lines. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 123, 678-686.
- ARENA, K., RIGANO, F., MANGRAVITI, D., CACCIOLA, F., OCCHIUTO, F., DUGO, L., DUGO, P. & MONDELLO, L. 2020. Exploration of Rapid Evaporative-Ionization Mass Spectrometry as a Shotgun Approach for the Comprehensive Characterization of Kigelia Africana (Lam) Benth. Fruit. *Molecules*, 25.
- ATTIA, Y. M., EL-KERSH, D. M., WAGDY, H. A. & ELMAZAR, M. M. 2018. Verbascoside: Identification, Quantification, and Potential Sensitization of Colorectal Cancer Cells to 5-FU by Targeting PI3K/AKT Pathway. *Sci Rep*, 8, 16939.
- AYGUN, N. 2018. Biological and Genetic Features of Neuroblastoma and Their Clinical Importance. *Current Pediatric Reviews*, 14, 73-90.
- BAO, X., LI, W., JIA, R., MENG, D., ZHANG, H. & XIA, L. 2023. Molecular mechanism of ferulic acid and its derivatives in tumor progression. *Pharmacol Rep*.
- BASSÈRES, D. S. & BALDWIN, A. S. 2006. Nuclear factor-κB and inhibitor of κB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*, 25, 6817-6830.
- BELLO, I., SHEHU, M. W., MUSA, M., ZAINI ASMAWI, M. & MAHMUD, R. 2016. Kigelia africana (Lam.) Benth. (Sausage tree): Phytochemistry and pharmacological review of a quintessential African traditional medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 189, 253-276.
- BISWAS, D. K., CRUZ, A. P., GANSBERGER, E. & PARDEE, A. B. 2000. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8542-7.
- BLEEKER, G., TYTGAT, G. A., ADAM, J. A., CARON, H. N., KREMER, L. C., HOOFT, L. & VAN DALEN, E. C. 2015. 123I-MIBG scintigraphy and 18F-FDG-PET imaging for diagnosing neuroblastoma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- BRAND, T. M., IIDA, M., LUTHAR, N., STARR, M. M., HUPPERT, E. J. & WHEELER, D. L. 2013. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol*, 108, 370-7.
- BRODEUR, G. M. 2003. Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer*, 3, 203-216.
- BRODEUR, G. M. 2018. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell Tissue Res*, 372, 277-286.
- CHANG, H. H., LU, M. Y., YANG, Y. L., CHOU, S. W., LIN, D. T., LIN, K. H., HSU, W. M., JENG, Y. M. & JOU, S. T. 2020. The prognostic roles of and correlation between ALK and MYCN protein expression in neuroblastoma. *Journal of Clinical Pathology*, 73, 154-161.

- CHEUNG, N.-K. V. & DYER, M. A. 2013. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 13, 397-411.
- CHIVANDI, E., CAVE, E., DAVIDSON, B. C., ERLWANGER, K. H., MOYO, D. & MADZIVA, M. T. 2012. Suppression of Caco-2 and HEK-293 cell proliferation by *Kigelia africana*, *Mimusops zeyheri* and *Ximenia caffra* seed oils. *In Vivo*, 26, 99-105.
- COLON, N. C. & CHUNG, D. H. 2011. Neuroblastoma. *Adv Pediatr*, 58, 297-311.
- COSTA, R., ALBERGAMO, A., PELLIZZERI, V. & DUGO, G. 2017. Phytochemical screening by LC-MS and LC-PDA of ethanolic extracts from the fruits of *Kigelia africana* (Lam.) Benth. *Natural Product Research*, 31, 1397-1402.
- COSTEA, T., VLAD, O. C., MICLEA, L.-C., GANEA, C., SZÖLLÖSI, J. & MOCANU, M.-M. 2020. Alleviation of Multidrug Resistance by Flavonoid and Non-Flavonoid Compounds in Breast, Lung, Colorectal and Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 401.
- DANESHFOROUZ, A., NAZEMI, S., GHOLAMI, O., KAFAMI, M. & AMIN, B. 2021. The cytotoxicity and apoptotic effects of verbascoside on breast cancer 4T1 cell line. *BMC Pharmacol Toxicol*, 22, 72.
- DOLCET, X., LLOBET, D., PALLARES, J. & MATIAS-GUIU, X. 2005. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*, 446, 475-482.
- DUTTA, J., FAN, Y., GUPTA, N., FAN, G. & GÉLINAS, C. 2006. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- $\kappa$ B. *Oncogene*, 25, 6800-6816.
- ERDMANN, F., KAATSCH, P., GRABOW, D. & SPIX, C. 2020. *German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018)* [Online]. Available: [https://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure\\_downloads/42507/0/1c5976c2ab8af5b6b388149df7182582a4cd6a39/Buch\\_DKKR\\_Jahresbericht\\_2019\\_komplett.pdf](https://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/42507/0/1c5976c2ab8af5b6b388149df7182582a4cd6a39/Buch_DKKR_Jahresbericht_2019_komplett.pdf) [Accessed 20.03.21].
- GILMORE, T. D. 2006. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25, 6680-6684.
- GUON, T.-E. & CHUNG, H. S. 2016. Induction of apoptosis with *Kigelia africana* fruits in HCT116 human colon cancer cells via MAPKs signaling pathway. *Natural Product Sciences*, 22, 209-215.
- HERO, B., SIMON, T., SPITZ, R., ERNESTUS, K., GNEKOW, A. K., SCHEEL-WALTER, H. G., SCHWABE, D., SCHILLING, F. H., BENZ-BOHM, G. & BERTHOLD, F. 2008. Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression: results of the prospective trials NB95-S and NB97. *J Clin Oncol*, 26, 1504-10.
- HIGGINS, C. A., BELL, T., DELBEDERI, Z., FEUTREN-BURTON, S., MCCLEAN, B., O'DOWD, C., WATTERS, W., ARMSTRONG, P., WAUGH, D. & VAN DEN BERG, H. 2010. Growth inhibitory activity of extracted material and isolated compounds from the fruits of *Kigelia pinnata*. *Planta Medica*, 76, 1840-1846.
- HOESEL, B. & SCHMID, J. A. 2013. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*, 12, 86.
- HÖGNASON, T., CHATTERJEE, S., VARTANIAN, T., RATAN, R. R., ERNEWEIN, K. M. & HABIB, A. A. 2001. Epidermal growth factor receptor induced apoptosis: potentiation by inhibition of Ras signaling. *FEBS Letters*, 491, 9-15.
- HOUGHTON, P. & JÄGER, A. 2002. The sausage tree (*Kigelia pinnata*): ethnobotany and recent scientific work. *South African Journal of Botany*, 68, 14-20.
- HOUGHTON, P. J., PHOTIOU, A., UDDIN, S., SHAH, P., BROWNING, M., JACKSON, S. J. & RETSAS, S. 1994. Activity of extracts of *Kigelia pinnata* against melanoma and renal carcinoma cell lines. *Planta Medica*, 60, 430-433.
- HUANG, M. & WEISS, W. A. 2013. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3, a014415.
- JACKSON, S. J., HOUGHTON, P. J., RETSAS, S. & PHOTIOU, A. 2000. In vitro cytotoxicity of norviburtinal and isopinnatal from *Kigelia pinnata* against cancer cell lines. *Planta Medica*, 66, 758-761.
- JIANG, C., ZHU, Y., ZHOU, Z., GUMIN, J., BENGTSSON, L., WU, W., SONGYANG, Z., LANG, F. F. & LIN, X. 2017. TMEM43/LUMA is a key signaling component

- mediating EGFR-induced NF- $\kappa$ B activation and tumor progression. *Oncogene*, 36, 2813-2823.
- KARIN, M. 1999. How NF- $\kappa$ B is activated: the role of the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 18, 6867-6874.
- KARIN, M. & BEN-NERIAH, Y. 2000. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- $\kappa$ B Activity. *Annual Review of Immunology*, 18, 621-663.
- KHATOON, E., BANIK, K., HARSHA, C., SAILO, B. L., THAKUR, K. K., KHWAIRAKPAM, A. D., VIKKURTHI, R., DEVI, T. B., GUPTA, S. C. & KUNNUMAKKARA, A. B. 2022. Phytochemicals in cancer cell chemosensitization: Current knowledge and future perspectives. *Semin Cancer Biol*, 80, 306-339.
- KHOLODENKO, I. V., KALINOVSKY, D. V., DORONIN, I. I., DEYEV, S. M. & KHOLODENKO, R. V. 2018. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *Journal of immunology research*, 2018, 7394268-7394268.
- KIM, B., MIN, Y. H. & PARK, B. 2020. Minocycline Modulates Cell Invasion via Regulation of CXCR4 Expression in Breast and Colon Cancer Cells. *Planta Med*, 86, 331-337.
- KUMAR, S., KUMAR, V. & PRAKASH, O. M. 2012. Antidiabetic and hypolipidemic activities of *Kigelia pinnata* flowers extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 543-546.
- LEHMAN, H. L., KIDACKI, M., WARRICK, J. I. & STAIRS, D. B. 2018. NF $\kappa$ B hyperactivation causes invasion of esophageal squamous cell carcinoma with EGFR overexpression and p120-catenin down-regulation. *Oncotarget*, 9, 11180-11196.
- LI, Z. N., ZHAO, L., YU, L. F. & WEI, M. J. 2020. BRAF and KRAS mutations in metastatic colorectal cancer: future perspectives for personalized therapy. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 8, 192-205.
- LIN, Y., SHI, R., WANG, X. & SHEN, H.-M. 2008. Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 8, 634-646.
- MACHY, P., MORTIER, E. & BIRKLÉ, S. 2023. Biology of GD2 ganglioside: implications for cancer immunotherapy. *Front Pharmacol*, 14, 1249929.
- MARIS, J. M. 2010. Recent advances in neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 362, 2202-2211.
- MEDINGER, M., UNGER, C. & DREVS, J. 2003. Pflanzliche Zytostatika. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 46, 1050-1054.
- MICHAELIS, M., BLISS, J., ARNOLD, S. C., HINSCH, N., ROTHWEILER, F., DEUBZER, H. E., WITT, O., LANGER, K., DOERR, H. W., WELS, W. S. & CINATL, J., JR. 2008. Cisplatin-resistant neuroblastoma cells express enhanced levels of epidermal growth factor receptor (EGFR) and are sensitive to treatment with EGFR-specific toxins. *Clin Cancer Res*, 14, 6531-7.
- MOHD, A. B., MOHD, O. B., ALABDALLAT, Y. J., AL DWAIRY, S. Y., GHANNAM, R. A., HANAQTAH, B. M. & ALBAKRI, K. A. 2023. Safety and efficacy of dinutuximab in the treatment of neuroblastoma: A review. *J Res Med Sci*, 28, 71.
- MUELLER, I., EHLERT, K., ENDRES, S., PILL, L., SIEBERT, N., KIETZ, S., BROCK, P., GARAVENTA, A., VALTEAU-COUANET, D., JANZEK, E., HOSTEN, N., ZINKE, A., BARTHLEN, W., VAROL, E., LOIBNER, H., LADENSTEIN, R. & LODE, H. N. 2018. Tolerability, response and outcome of high-risk neuroblastoma patients treated with long-term infusion of anti-GD(2) antibody ch14.18/CHO. *MAbs*, 10, 55-61.
- NAKAGAWARA, A., LI, Y., IZUMI, H., MURAMORI, K., INADA, H. & NISHI, M. 2018. Neuroblastoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 48, 214-241.
- NAZHA, B., INAL, C. & OWONIKOKO, T. K. 2020. Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy. *Frontiers in oncology*, 10, 1000-1000.

- NIEDER, M. L. & GAUDERER, M. W. 1991. Recent developments in the management of neuroblastoma. In: GAUDERER, M. W. L. & ANGERPOINTNER, T. A. (eds.) *Progress in Pediatric Surgery: Surgery for Endocrinological Diseases and Malformations in Childhood*. 1991/01/01 ed. Berlin, Heidelberg: Springer.
- NJOGU, S. M., ARIKA, W. M., MACHOCHO, A. K., NGERANWA, J. J. N. & NJAGI, E. N. M. 2018. In Vivo Hypoglycemic Effect of *Kigelia africana* (Lam): Studies With Alloxan-Induced Diabetic Mice. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 23, 2515690x18768727.
- OLALEYE, M. T. & ROCHA, B. T. 2008. Acetaminophen-induced liver damage in mice: effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59, 319-327.
- PISTOIA, V., BIANCHI, G., BORGONOVO, G. & RAFFAGHELLO, L. 2011. Cytokines in neuroblastoma: from pathogenesis to treatment. *Immunotherapy*, 3, 895-907.
- REN, Y., HE, J., ZHAO, W. & MA, Y. 2022. The Anti-Tumor Efficacy of Verbascoside on Ovarian Cancer via Facilitating CCN1-AKT/NF- $\kappa$ B Pathway-Mediated M1 Macrophage Polarization. *Front Oncol*, 12, 901922.
- RITENOUR, L. E., RANDALL, M. P., BOSSE, K. R. & DISKIN, S. J. 2018. Genetic susceptibility to neuroblastoma: current knowledge and future directions. *Cell and Tissue Research*, 372, 287-307.
- ROY, N., NARAYANANKUTTY, A., NAZEEM, P. A., VALSALAN, R., BABU, T. D. & MATHEW, D. 2016. Plant Phenolics Ferulic Acid and P-Coumaric Acid Inhibit Colorectal Cancer Cell Proliferation through EGFR Down-Regulation. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17, 4019-23.
- RUIZ-PÉREZ, M. V., HENLEY, A. B. & ARSENIAN-HENRIKSSON, M. 2017. The MYCN Protein in Health and Disease. *Genes (Basel)*, 8.
- SABBAH, D. A., HAJJO, R. & SWEIDAN, K. 2020. Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 20, 815-834.
- SAINI, S., KAUR, H., VERMA, B. & SINGH, S. 2009. *Kigelia africana* (Lam.) Benth.—An overview. *Natural Product Radiance*, 8, 190-197.
- SAIT, S. & MODAK, S. 2017. Anti-GD2 immunotherapy for neuroblastoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17, 889-904.
- SAKURAI, H., SUZUKI, S., KAWASAKI, N., NAKANO, H., OKAZAKI, T., CHINO, A., DOI, T. & SAIKI, I. 2003. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced IKK Phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 on Serine 536 Is Mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 Signaling Pathway\*. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 36916-36923.
- SCHILLING, F. H., SPIX, C., BERTHOLD, F., ERTTMANN, R., FEHSE, N., HERO, B., KLEIN, G., SANDER, J., SCHWARZ, K., TREUNER, J., ZORN, U. & MICHAELIS, J. 2002. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med*, 346, 1047-53.
- SCHÜNKE, M., SCHULTE, E., SCHUMACHER, U., VOLL, M. & WESKER, K. 2012. *Prometheus Kopf, Hals und Neuroanatomie*, S. 262, Thieme.
- SIMON, T., HERO, B., EGGERT, A., LODE, H., FISCHER, M., TIMMERMANN, B., SCHWARZ, R., FUCHS, J. R., VON SCHWEINITZ, D., VOKUHL, C., SCHMIDT, M., KÖRBER, F. & SCHÄFER, J. 2019. *Leitlinie: Neuroblastom. S1-Leitlinie 025-008* [Online]. AWMF online. Available: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/025-008.html> [Accessed 30.03.2020].
- SINGH, A., KUMARI, S., SINGH, A. K. & SINGH, N. K. 2018. Ethnopharmacology and pharmacology of *Kigelia africana* (Lam.) Benth. *International Journal of Green Pharmacy* 12.
- SWIFT, C. C., EKLUND, M. J., KRAVEKA, J. M. & ALAZRAKI, A. L. 2018. Updates in Diagnosis, Management, and Treatment of Neuroblastoma. *Radiographics*, 38, 566-580.
- TERGAONKAR, V. 2006. NF $\kappa$ B pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, 1647-1653.



- TILBORGHES, S., CORTHOUTS, J., VERHOEVEN, Y., ARIAS, D., ROLFO, C., TRINH, X. B. & VAN DAM, P. A. 2017. The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 120, 141-150.
- WHITTLE, S. B., SMITH, V., DOHERTY, E., ZHAO, S., MCCARTY, S. & ZAGE, P. E. 2017. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17, 369-386.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION 2013. *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*, Geneva, World Health Organization.
- WRIGHT, J. H. 1910. NEUROCYTOMA OR NEUROBLASTOMA, A KIND OF TUMOR NOT GENERALLY RECOGNIZED. *J Exp Med*, 12, 556-61.
- YAN, G. E. & EFFERTH, T. 2019. Broad-spectrum Cross-resistance to Anticancer Drugs Mediated by Epidermal Growth Factor Receptor. *Anticancer Res*, 39, 3585-3593.
- YANI, D. F., SUGITA, P. & SYAHBIRIN, G. 2018. Phytochemicals and cytotoxicity of sausage fruit (*Kigelia africana*) extract against breast cancer cells MCF-7 in vitro. *Journal of Pharmacy Research*, 12, 288-292.
- ZHENG, C., SHEN, R., LI, K., ZHENG, N., ZONG, Y., YE, D., WANG, Q., WANG, Z., CHEN, L. & MA, Y. 2016. Epidermal growth factor receptor is overexpressed in neuroblastoma tissues and cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 48, 762-7.

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die es mir mit Ihrer Unterstützung ermöglicht haben, diese Arbeit zu verfassen:

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Konrad Reinshagen bedanken, der es mir ermöglichte in seiner Forschungsgruppe des Labors der Kinderchirurgie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zu arbeiten. Ich danke ihm für die Überlassung dieses Themas, die ermutigende Förderung, wertvolle Unterstützung und die Möglichkeiten, die er mir hierdurch eröffnet hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Laia Pagerols Raluy für die zuverlässige Betreuung während der Arbeit im Labor und danach, die vielen Ratschläge und gemeinsamen lehrreichen Stunden im Labor. Ich danke ihr, dass ich sie zu jeder Tages- und Nachtzeit mit Fragen belästigen durfte, für die nette Arbeitsatmosphäre und Geduld und für die vielen Korrekturstunden, die sie für diese Arbeit aufgebracht hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitgliedern des Kinderchirurgie-Forschungsteams bedanken, die zu dieser Arbeit beigetragen haben, die hier jedoch nicht alle einzeln namentlich genannt sind. Besonders danke ich Magda Trochimiuk, die mich zu Beginn meiner Arbeit in die Labormethodik einführte, mich bei Experimenten unterstützte und mir immer hilfsreich und mit viel Humor zur Seite stand. Ein großer Dank geht an dieser Stelle auch an Birgit Appl und Dr. Julian Trah für die netten Stunden im Labor. Sofia Ahrens danke ich für die gemeinsame Arbeit und ihre Unterstützung.

Jurek Hille möchte ich herzlich für die tatkräftige Unterstützung in Sachen Statistik und die motivierenden Worte in schwierigen Phasen danken.

Und zu guter Letzt möchte ich ganz besonders meiner Familie danken, die mir immer mit grenzenloser Unterstützung und Motivation den Rücken stärkt und mir mit ihrem bedingungslosem Vertrauen Kraft gibt.

## 12 Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik der Kinderchirurgie unter Betreuung von Prof. Dr. Konrad Reinshagen durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Pagerols Raluy.

Sämtliche Versuche bis auf die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder) von mir eigenständig mit Unterstützung durch Frau Dr. Pagerols Raluy, Frau Trochimiuk und Frau Appel durchgeführt und ausgewertet. Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde nach Vorbereitung der verwendeten Proben durch mich von Frau Dr. Pagerols Raluy durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

C. Schwippert

## 13 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

19.06.2025

Datum



Unterschrift